

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**INMUNODOMINANCIA Y PROCESAMIENTO DE EPÍTOPOS DE LA
GLICOPROTEÍNA F DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO
RECONOCIDOS POR LINFOCITOS T CITOTÓXICOS CD8⁺ MURINOS**

Memoria presentada por Carolina Johnstone España
para optar al Grado de Doctor en Ciencias

Director: Dra. Margarita del Val Latorre
Jefe de Sección de Inmunología Viral
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III

Tutor: Dr. Juan Ortín Montón
Profesor de Investigación del CSIC

Madrid, mayo 2006

A mis padres y a mi hermana favorita.

A Felipe, que le pone música a mi vida.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera expresar mi agradecimiento a la Dra. Margarita del Val, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por darme libertad a la hora de llevar a cabo el trabajo diario y permitirme compaginarlo con mi vida personal, sobre todo, por la dirección del trabajo en estos 5 años. Mi agradecimiento también para el Dr. Juan Ortín por la tutela de esta tesis en la UAM.

Quiero resaltar la contribución que han hecho todos los que han sido mis compañeras y compañeros a lo largo de estos años, tanto en la unidad de Inmunología Viral como en la de Proteómica. La ciencia se hace en equipo por lo que estoy segura de que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. Mi más profundo agradecimiento a todos y cada uno de ellos.

Habría estado perdida si no hubiera sido por la generosidad de Yoli y Patricia que me enseñaron la mayor parte de las técnicas necesarias para realizar este trabajo, y también a Marta que me iba enseñando a medida que aprendíamos juntas. Gracias por resolverme las dudas que me iban surgiendo en el día a día, por vuestras aportaciones a este trabajo, y sobre todo gracias por vuestra amistad; Yoli gracias por estar ahí todos los días. A Marta R. y Sara, gracias por enseñarme y resolverme dudas siempre que lo he necesitado, especialmente en el tedioso mundo de los inhibidores, por ser buenas compañeras para este largo camino. A Sara, gracias además por los numerosos controles de todo para todos, especialmente por los presentados en este trabajo, gracias por tus regalitos que nos alegran el día, y por compartir los desahogos en este eterno tramo final. Gracias a Daniel por la inmunización de ratones, por su confianza cuando yo era novata en la reestimulación, y sobre todo por sus aportaciones en los seminarios. A Fran, Manolo y Miguel, gracias por enseñarme todo lo referente a citometría, por aportar siempre ideas y resolverme dudas; a Manolo también por compartir las matanzas infructuosas del tramo final. A Miguel, gracias también por la producción de VRS, por los controles de infección, y por contestarme siempre a mis dudas en un tiempo récord digno de un superhéroe. A Rosa, que nos cambió la vida a color cristal violeta, gracias por estar siempre disponible para enseñarme cosas nuevas, por los buenos ratos, por tu apoyo. Gracias por realizar gran parte del trabajo con rVV a Fernando, Susana y Carmen; a Fernando también por su trabajo con el HPLC; a Susana además mil gracias por tu ayuda con las referencias bibliográficas; y a Carmen, gracias Mari por las cosas de diario que me han facilitado el trabajo durante todos estos años. A Noemí, gracias por los ratos que hemos compartido. Gracias a Paco, por animarme en los seminarios. Gracias a Ana y Salva, mis compañeros nuevos que no me han visto ni el pelo pero que me han hecho todos los favorcitos que les he ido pidiendo. A otras compañeras nuevas, Laura y Susana; y a Juan Carlos, por las sugerencias para resolver nuestros problemas microscópicamente.

Los resultados presentados son fruto de una colaboración con la unidad de Biología Viral dirigida por el Dr. J. A. Melero, quien ha hecho aportaciones muy valiosas a este trabajo, no sólo proporcionándonos todo lo que hemos necesitado, sino diseñando experimentos y aportando siempre una respuesta para los resultados dudosos. Gracias a las Dras. B. García-Barreno, C. Palomo, y B. Ruiz-Argüello por proporcionarme inóculos de virus y líneas celulares. En general gracias a todos los miembros de la unidad por darme información cuando la he necesitado.

Gracias al Servicio de Proteómica por la síntesis de péptidos. A aquellos que nos están ayudando a poner a punto la técnica de lavado broncoalveolar, a Lucinio y Enrique del Servicio de Experimentación Animal, y al Dr. A. Zaballos del CBM.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Inmunobiología por resolverme dudas del citómetro, por ser buenos vecinos. A todos los compañeros del ISCIII con los que he compartido buenos y malos ratos durante estos 5 años, en especial a David, Toni, y a Natalia.

Quiero agradecer a algunas personas que en el pasado me animaron y ayudaron a seguir este camino, a los Drs. F. Alonso y E. Rodríguez-Bejarano de la Universidad de Málaga, al Dr. J. Hoggett y a la Dra. J. Southgate de la Universidad de York, y especialmente a la Dra. A. Proudfoot del SPRI en Ginebra.

§

En lo personal, gracias a todos los que sois mi familia y amigos por vuestro cariño y apoyo incondicional.

A mis amigas Aitzi, Alicia, Ana, Ángela, Cris, Cristi, Elena, Irene, Macarena, Rosa, Rocío, Verónica. A Guille, a Juan. A Tangana y familias.

A mi Yaya, a mis abuelos, tíos y primos en Málaga y en la Isla de Man.

A mis otras familias, Milano-Curto, García-González, Carpintero-Rogero, a Kate, a Vicky.

A mis compañeros y profesores en el Colegio Platero, por la educación que recibí allí.

I specially want to thank my grandparents Joyce and Phil for their loving support, for their contribution to my education, for helping me out with the MRes course.

A mis padres, gracias por darme una educación en valores, por darme la libertad de elegir, y sobre todo por darme el mejor regalo del mundo, mi hermana. Gracias a los tres por hacerme más llevadero el estar tan lejos todos los días. A Migue, gracias por cuidar a toda la familia cuando yo no estoy.

A Felipe, mi compañero en la salud y en las enfermedades derivadas de esta tesis, en la riqueza y en la pobreza de ser becario, prometo serte fiel y no volver a hacer otra tesis, gracias por todo lo que ya sabes.

Índice

ABREVIATURAS	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS PARA SU PRESENTACIÓN POR MHC DE CLASE I A CTL	3
1.1.1. Vía clásica de procesamiento y presentación de antígeno por MHC de clase I a CTL	3
1.1.1.1. El proteasoma	3
1.1.1.2. TPPII, TOP, y otras peptidasas citosólicas	6
1.1.1.3. Los transportadores TAP	7
1.1.1.4. Aminopeptidasas de RE asociadas al procesamiento de antígeno	8
1.1.1.5. Las moléculas de MHC de clase I	9
1.1.1.6. El complejo de carga de MHC de clase I	9
1.1.2. Vías alternativas de presentación de antígeno por MHC de clase I a CTL	10
1.1.3. Activación de linfocitos T CD8 ⁺	13
1.1.3.1. Vías de presentación cruzada para la activación de linfocitos T CD8 ⁺ ...	13
1.1.3.2. CTL efectores y de memoria	14
1.1.4. Inmunodominancia	15
1.2. EL VIRUS VACCINIA EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR	15
1.2.1. El virus vaccinia y su ciclo de replicación	15
1.2.2. Los virus vaccinia recombinantes (rVV) en el estudio de la respuesta inmune celular	16
1.3. EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO Y SU PROTEÍNA DE FUSIÓN	17
1.3.1. Características del virus respiratorio sincital (VRS)	17
1.3.1.1. La proteína F de VRS	18
1.3.2. Patología causada por la infección con VRS humano	19
1.3.3. Respuesta inmune a la infección con VRS humano	20
1.3.3.1. Papel de los CTL en la respuesta inmune a VRS humano	20
1.3.3.2. Papel de la proteína F en la respuesta inmune a VRS humano	21

2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. REACTIVOS	23
3.1.1. Medios de cultivo	23
3.1.2. Productos químicos	23
3.1.3. Productos inmunoquímicos	24
3.1.4. Péptidos	24
3.2. LÍNEAS CELULARES Y SU CULTIVO	24
3.2.1. Líneas celulares	24
3.2.2. Cultivo de líneas celulares	25
3.3. VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL	25
3.4. VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES	26
3.4.1. rVV que expresan formas de la proteína F de VRS Long	26
3.4.2. Otros rVV	27
3.4.3. Producción, purificación y titulación de rVV	28
3.5. INFECCIONES VIRALES	28
3.6. INMUNIZACIÓN DE RATONES	29
3.7. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS DE CTL POLICLONALES ESPECÍFICAS DE LA PROTEÍNA F	30
3.8. ENSAYOS FUNCIONALES DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO A CTL	32
3.8.1. Ensayos de citotoxicidad	32
3.8.2. Ensayos de tinción intracelular de citoquinas (ICS) con líneas de CTL	33
3.8.3. Ensayos de ICS con esplenocitos <i>ex vivo</i>	34

4. RESULTADOS	35
4.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CTL E IDENTIFICACIÓN DE LOS EPÍTOPOS F85-93 Y F249-258 EN LA PROTEÍNA F DE LA CEPA LONG DE VRS	35
4.1.1. Confirmación de F85-93 como epítipo conservado mediante el empleo de líneas de CTL generadas <i>in vitro</i> específicas de la proteína F	35
4.1.2. Identificación del epítipo de CTL F249-258 en la proteína F	40
4.1.3. Generación <i>in vitro</i> de líneas de CTL específicas de los epítipos F85-93 y F249-258 a partir de ratones infectados con VRS	47
4.2. INMUNODOMINANCIA DEL EPÍTOPO F85-93 SOBRE EL EPÍTOPO F249-258 EN LÍNEAS DE CTL GENERADAS <i>IN VITRO</i> Y EN LA INFECCIÓN DE RATONES <i>IN VIVO</i>	50
4.2.1. Inmunodominancia del epítipo F85-93 sobre el epítipo F249-258 en líneas de CTL generadas <i>in vitro</i>	50
4.2.2. Inmunodominancia del epítipo F85-93 sobre el epítipo F249-258 en la infección de ratones con vvF <i>in vivo</i>	53
4.2.3. Los epítipos F85-93 y F249-258 son ambos subdominantes en la infección de ratones con VRS Long <i>in vivo</i>	54
4.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE LOS EPÍTOPOS F85-93 Y F249-258	56
4.3.1. Procesamiento endógeno e independiente de TAP de epítipos presentados por K ^d a CTL F/BCH4 en células infectadas con rVV	56
4.3.2. En células infectadas con rVV, ambos epítipos, F85-93 y F249-258, se presentan independientemente de TAP pero por vías diferentes	59
4.3.3. El epítipo F85-93 expresado en rVV es también procesado por el proteasoma en una vía de presentación dependiente de TAP, a diferencia del epítipo F249-258	61
4.3.4. Presentación endógena independiente de TAP de F85-93 en células infectadas con rVV	63
4.3.5. Presentación exógena e independiente de TAP de F249-258 en células infectadas con rVV	67

4.3.6. Procesamiento y presentación de los epítopos F85-93 y F249-258 en células infectadas con VRS	69
5. DISCUSIÓN	72
5.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CTL ESPECÍFICAS DE LA PROTEÍNA F DE VRS LONG E IDENTIFICACIÓN DE LOS EPÍTOPOS RECONOCIDOS	72
5.2. MÚLTIPLES VÍAS DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE EPÍTOPOS DE LA PROTEÍNA F	74
5.2.1. Vías de procesamiento del epítipo F85-93	76
5.2.2. Vías de procesamiento del epítipo F249-258	78
5.3. PATRÓN DE INMUNODOMINANCIA DE EPÍTOPOS DE LA PROTEÍNA F Y PERSPECTIVAS DE VACUNACIÓN	82
5.3.1. Inmunodominancia de F85-93 sobre F249-258	82
5.3.2. Perspectivas de vacunación	85
6. CONCLUSIONES	87
7. BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXO.....	100

Abreviaturas

aa: aminoácido

$\beta_2\text{m}$: β_2 -microglobulina

BFA: brefeldina A

BSA: seroalbúmina bovina (*bovine serum albumin*)

CTL: linfocitos T citotóxicos CD8^+ (*cytotoxic T lymphocytes*)

DRiPs: productos ribosomales defectivos (*defective ribosomal products*)

E:D: relación entre células efectoras y células diana

ERAP y ERAAP: aminopeptidasa de RE asociada al procesamiento de antígeno

E:S: relación entre células efectoras y células estimuladoras

ICS: tinción intracelular de citoquinas (*intracellular cytokine staining*)

$\text{IFN}\gamma$: interferón γ

IL2: interleuquina 2

LC: lactacistina

LeuSH: leucíntiol

mAb: anticuerpo monoclonal (*monoclonal antibody*)

MHC: complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)

m.o.i.: multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*)

pAPC: células presentadoras de antígeno profesionales (*professional antigen presenting cells*)

R : resistente a inhibidor

RE: retículo endoplásmico

rVV: virus vaccinia recombinante (*recombinant vaccinia virus*)

S : sensible a inhibidor

SBF: suero bovino fetal

TAP: transportador asociado al procesamiento de antígeno

TCR: receptor de la célula T (*T cell receptor*)

TGN: red del *trans*-Golgi (*trans-Golgi network*)

TPPII: tripeptidil peptidasa II

u.f.p.: unidades formadoras de placa

VRS: virus respiratorio sincitial

Summary

Human respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of respiratory infection in children and in the elderly. The RSV fusion (F) glycoprotein has long been recognized as a vaccine candidate as it elicits cytotoxic T lymphocyte (CTL) and antibody responses. Two murine H-2K^d-restricted CTL epitopes (F85-93 and F92-106) are known in the F protein of the A2 strain of RSV. We generated F-specific CTL lines using BCH4 fibroblasts that are persistently infected with the Long strain of human RSV as stimulators and found that in this strain only the F85-93 epitope is conserved. Motif based epitope prediction programmes and an F2 chain deleted F protein encoded in a recombinant vaccinia virus (rVV) enabled us to identify a new epitope in the Long strain, F249-258, which is presented by K^d as a 9mer (TYMLTNSSEL) or a 10mer (TYMLTNSSELL) peptide. F249-258-specific CTL are induced *in vivo* during the immune response to RSV or to vvF, a rVV encoding the entire F protein.

The immunodominance pattern between epitopes F85-93 and F249-258 was assessed by quantifying CD8⁺ T-lymphocyte responses to epitopes F85-93 and F249-258. Our results show CD8⁺ T-lymphocyte responses are strongly skewed to F85-93 in *in vitro* multispecific CTL lines and *in vivo* during a secondary response to vvF. However, no hierarchy in CD8⁺ T-lymphocyte responses to F85-93 and F249-258 epitopes was observed *in vivo* during a primary response.

Processing and presentation of epitopes F85-93 and F249-258 was studied and major differences in presentation pathways were found depending on the epitope and on the viral context of the antigen. Epitope F85-93 is presented through an endogenous pathway dependent on the transporters associated with antigen processing (TAP) when the F protein is in either RSV or rVV context. The proteasome mediates this pathway in cells infected with rVV encoding either native F protein, a cytosolic form, or a form that is retained before the *mid*-Golgi. Moreover, in rVV-infected cells, an additional endogenous TAP-independent presentation pathway is also functioning for this epitope. In contrast, epitope F249-258 is mainly presented through two TAP-independent pathways when the F protein is expressed from RSV or rVV, that differ in that presentation is endogenous or mostly exogenous, respectively.

Our results contribute to the study in murine models of the role of CTL in the immune response to RSV F protein, and underscore the diversity of MHC class I processing pathways available for presentation of epitopes to CTL.

1. Introducción

1.1. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS PARA SU PRESENTACIÓN POR MHC DE CLASE I A CTL.

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I presentan péptidos en la superficie de todas las células nucleadas del cuerpo. Los péptidos presentados son de un tamaño medio de 9 aminoácidos (aa) y resultan del procesamiento de proteínas propias y extrañas de síntesis endógena o exógena. Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) reconocen a través de su receptor de célula T (TCR) estos complejos MHC/péptido en la superficie de otras células. Las infecciones virales desencadenan en el organismo una respuesta inmune celular que permite la proliferación de CTL que reconocen específicamente moléculas de MHC de clase I cargadas con péptidos (epítopos) virales. De este modo los CTL son capaces de diferenciar las células sanas de las infectadas, las cuales son eliminadas por medio de su acción citotóxica.

1.1.1. Vía clásica de procesamiento y presentación de antígeno por MHC de clase I a CTL.

En la vía convencional de procesamiento de antígeno los péptidos presentados a CTL derivan de la degradación en el citosol de proteínas endógenas por el proteasoma. Los transportadores asociados al procesamiento de antígeno (TAP) translocan péptidos del citosol al lumen del retículo endoplásmico (RE) donde pueden ser recortados por aminopeptidasas. En función de su afinidad, que viene determinada por su tamaño y secuencia, algunos de los péptidos transportados se ensamblan en un complejo estable formado por la cadena pesada naciente de la molécula de MHC de clase I, la proteína β_2 -microglobulina (β_2m) y el péptido. El complejo de MHC de clase I cargado con péptido sale del RE y es transportado por la vía secretoria constitutiva a la superficie celular para su presentación a CTL.

La vía clásica de procesamiento y presentación de antígeno por MHC de clase I se explica en mayor profundidad en los siguientes apartados, y se representa esquemáticamente en la **Figura 1**.

1.1.1.1. El proteasoma.

El proteasoma es la principal proteasa degradativa de la célula, está altamente conservada, y está presente tanto en el citosol como en el núcleo. Es un complejo proteolítico multicatalítico que degrada selectivamente proteínas poliubiquitinadas, proteínas en las que se han incorporado colas de ubiquitina como señal de degradación para evitar la destrucción indiscriminada de proteínas. El proteasoma 26S se compone de un núcleo

catalítico denominado proteasoma 20S, y de dos complejos reguladores 19S que se unen a cada extremo del núcleo catalítico permitiendo la unión y el despliegue de los sustratos ubiquitinados.

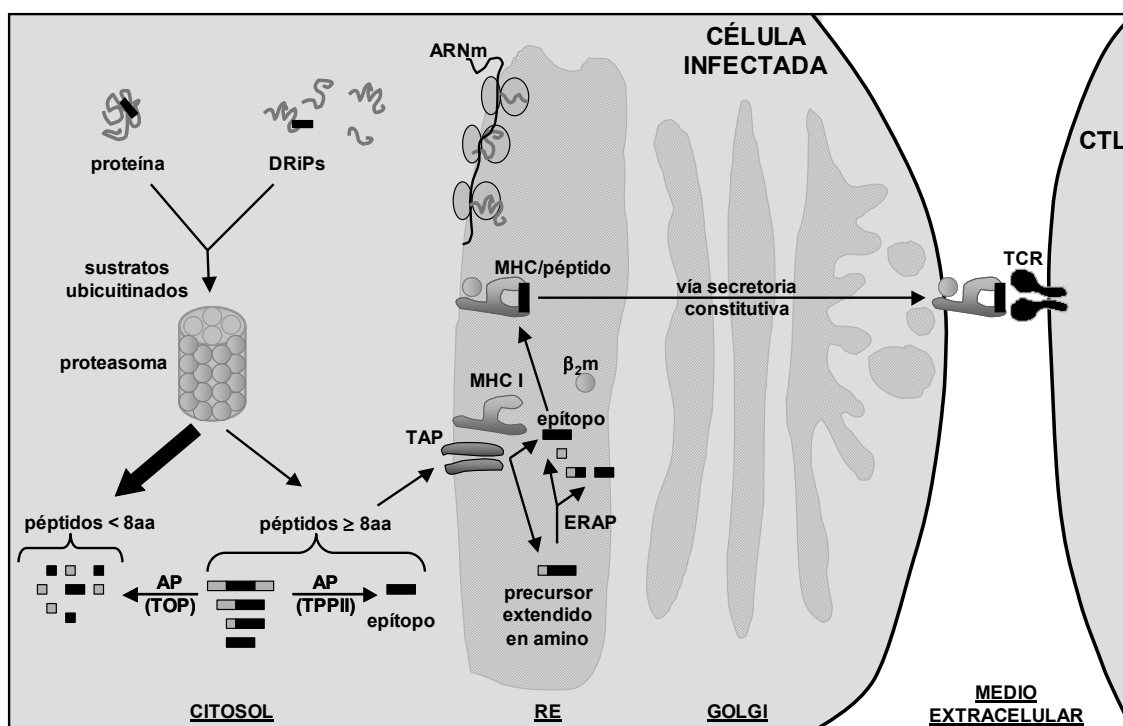


Figura 1. La vía clásica de procesamiento y presentación de antígeno por MHC de clase I a CTL. En la vía clásica de procesamiento de antígeno los péptidos presentados a CTL derivan de la degradación en el citosol de proteínas por el proteasoma. Los sustratos del proteasoma están ubiquitinados, y son mayormente productos ribosomales defectivos (DRiPs) o proteínas endógenas. Los productos del proteasoma son principalmente péptidos de menos de 8 aa, pero también se generan péptidos de 8 o más aa que pueden incluir epítopos o sus precursores. Los péptidos producidos por el proteasoma son sustrato de aminopeptidasas citosólicas (AP), de entre las cuales TOP suele destruir epítopos, mientras que TPPII puede recortar precursores generando epítopos. Los péptidos citosólicos de más de 8 aa son transportados al RE por los transportadores TAP. En el RE la aminopeptidasa ERAP recorta precursores extendidos en el extremo amino generando epítopos, aunque también puede destruirlos. Con la ayuda de chaperonas de RE el epítipo final se ensambla en un complejo trimolecular estable con la cadena pesada de MHC de clase I y la proteína β_2m . El complejo de MHC de clase I cargado con el epítipo (MHC/péptido) es exportado por la vía secretoria constitutiva hasta la superficie celular para su presentación a CTL. El reconocimiento de un complejo MHC/péptido cargado con un epítipo viral por un CTL específico de ese epítipo ocurre a través del TCR, y desencadena la activación del CTL que induce la apoptosis de la célula infectada.

El proteasoma 20S está constituido por cuatro anillos apilados a modo de barril. Los dos anillos externos están formados cada uno por 7 subunidades α diferentes, y tienen una función estructural actuando como puerta de entrada para evitar la degradación indiscriminada de proteínas. La activación y apertura de esta puerta puede ocurrir por la interacción del proteasoma 20S tanto con el regulador 19S como con el complejo activador PA28. Los dos anillos centrales del proteasoma 20S delimitan un canal central donde se realiza la proteólisis de los sustratos, y consta cada uno de 7 subunidades β diferentes. Tres

de estas subunidades, $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$, presentan sitios activos y una especificidad de corte diferente. La subunidad $\beta 1$ corta a continuación de residuos ácidos (actividad caspasa), la subunidad $\beta 2$ a continuación de residuos básicos (actividad tipo tripsina), y $\beta 5$ de residuos hidrofóbicos (actividad quimiotriptica). Sin embargo, el proteasoma es promiscuo ya que prácticamente cualquier aa puede ser un sitio de corte (Kloetzel 2004).

La expresión de interferón γ (IFN γ) induce la formación del inmunoproteasoma alterando la composición del complejo 20S mediante la sustitución, de forma cooperativa, de las subunidades β catalíticas por otras diferentes, las inmunosubunidades LMP2 ($i\beta 1$), MECL1 ($i\beta 2$) y LMP7 ($i\beta 5$). Además, IFN γ incrementa la expresión del activador PA28 y la cantidad de proteasoma/inmunoproteasoma 20S libre (Strehl y col. 2005). Así pues, existe un proteasoma constitutivo, que se expresa en todas las células, y un inmunoproteasoma, que se expresa bajo la influencia de IFN γ . Sin embargo, el inmunoproteasoma no es más eficiente que el proteasoma produciendo epítomos, sólo es diferente, y en conjunto se han documentado tanto efectos positivos como negativos del inmunoproteasoma en el procesamiento de antígeno (Van den Eynde y Morel 2001; Kloetzel y Ossendorp 2004).

El proteasoma degrada proteínas sintetizadas endógenamente que han llevado a cabo su función o incluso proteínas de origen exógeno. Sin embargo, uno de los principales sustratos degradados por el proteasoma son los DRiPs, productos ribosomales defectivos que constituyen una fuente importante de péptidos presentados por MHC de clase I (Yewdell y col. 1996; Yewdell 2002). Los DRiPs son proteínas degradadas cotraduccionalmente o inmediatamente después de la traducción, posiblemente como resultado de un mal plegamiento o una traducción defectuosa. Los DRiPs constituyen en torno al 30% de las moléculas recién sintetizadas de cada proteína (Schubert y col. 2000; Princiotta y col. 2003), y probablemente representen casi todas las proteínas expresadas en una célula. La ventaja de que los DRiPs sean fuente de epítomos es que permiten monitorizar a tiempo real lo que está ocurriendo en la célula, de forma que se pueden presentar péptidos virales en etapas iniciales de la infección.

El proteasoma se considera la principal proteasa generadora de péptidos presentados por MHC de clase I, siendo una de sus funciones generar el extremo carboxilo correcto de epítomos (Shastri y col. 2005). Esto es consecuencia de la ausencia de actividad carboxipeptidasa en el RE (Powis y col. 1996), lo cual implica que el extremo carboxilo de ligandos de MHC de clase I debe ser generado por una endoproteasa, siendo el proteasoma la principal actividad endoproteasa de la célula. Inicialmente el papel del proteasoma en el procesamiento de antígeno se demostró tratando células con inhibidores específicos del proteasoma que impedían la generación de un gran número de epítomos de CTL (Rock y col. 1994; Cerundolo y col. 1997). Posteriormente mediante digestiones *in vitro* se demostró que el proteasoma genera péptidos de 3 a 22 residuos, siendo la mayoría de los productos

demasiado cortos para unirse a moléculas de MHC de clase I ya que sólo el 15% tiene el tamaño adecuado (Kisselev y col. 1999).

El citosol es un medio muy agresivo para los péptidos pues hay numerosas peptidasas que los degradan rápidamente. En concreto, el análisis con péptidos marcados introducidos en células vivas indica que se degradan en segundos, y exclusivamente por aminopeptidasas, ya que péptidos protegidos en el extremo amino son estables (Reits y col. 2003; Reits y col. 2004). Por lo tanto, los productos del proteasoma son sustratos para peptidasas citosólicas que parecen ser exclusivamente aminopeptidasas.

1.1.1.2. TPPII, TOP, y otras peptidasas citosólicas.

La tripeptidil peptidasa II (TPPII) es una serínproteasa de gran tamaño compuesta por multímeros de una subunidad única, y presenta actividad tripeptidil peptidasa y endoproteolítica. Experimentos *in vivo* indican que TPPII prefiere sustratos de más de 15 aa (Reits y col. 2004). Normalmente TPPII elimina 2 ó 3 aa del extremo amino (Tomkinson 1999) a no ser que encuentre una P. No obstante puede cortar a una distancia de más de 9 aa del extremo amino, con lo cual podría generar el extremo carboxilo de un ligando de MHC de clase I. Cada vez parece más aceptado el papel de TPPII en el recorte de aa en el extremo amino de péptidos largos. De hecho TPPII está implicada en el recorte del extremo amino de precursores de epítomos *in vitro* (Lévy y col. 2002), y en la producción independiente del proteasoma de un epítomo *in vivo* (Seifert y col. 2003). El proteasoma participa en la destrucción de epítomos, y al menos en uno de estos casos la TPPII es indispensable para su procesamiento antigénico (Guil y col. enviado).

La oligopeptidasa thimet (TOP) y la neurolisina son peptidasas homólogas entre sí, de expresión ubicua, y que cortan sustratos de 9-17 aa (Oliveira y col. 2001; Saric y col. 2004), incluyendo péptidos producto del proteasoma. Cortan a una distancia de entre 4 y 10 aa del extremo amino (Oliveira y col. 2001), por lo que también podrían generar el extremo carboxilo de un ligando de MHC de clase I. A pesar de ser homólogas generan diferentes péptidos a partir de un mismo sustrato debido a diferencias en sus centros activos (Ray y col. 2004). Inicialmente TOP se describió como proteasa implicada en la generación de péptidos antigénicos (Portaro y col. 1999; Silva y col. 1999). Posteriormente se ha visto que más bien destruye péptidos antigénicos limitando la disponibilidad de ligandos de MHC de clase I (York y col. 2003).

Aminopeptidasas citosólicas como la aminopeptidasa sensible a puomicina (PSA), la leucín aminopeptidasa (LAP), o la bleomicín hidrolasa (BH), pueden recortar precursores para generar o destruir un epítomo. PSA y BH son capaces de recortar extensiones en el extremo amino de precursores producto del proteasoma para generar *in vitro* el epítomo correcto (Lévy y col. 2002; Stoltze y col. 2000). LAP es una metalopeptidasa que prefiere aa

hidrofóbicos en el extremo amino (Turzynski y Mentlein 1990), se induce por IFN γ , y esto promueve la generación de un epítipo *in vitro* a partir de un precursor producto del proteasoma extendido en el extremo amino (Beninga y col. 1998). Finalmente otras peptidasas citosólicas se encargan de terminar de degradar los péptidos a aa, un proceso crítico para la supervivencia celular.

Por lo tanto si bien el proteasoma es el principal candidato para generar el extremo carboxilo de ligandos de MHC de clase I, peptidasas citosólicas como TPPII, o incluso TOP o neurolisina, podrían procesar productos del proteasoma generando un nuevo extremo carboxilo. Estas y otras aminopeptidasas citosólicas pueden recortar precursores extendidos en el extremo amino para generar el extremo amino de ligandos de MHC de clase I o destruirlo. No obstante, no todos los ligandos de MHC de clase I sufren un recorte proteolítico, ya que por ejemplo se ha descrito el caso excepcional de un ligando natural de 15 aa con 6 aa extendidos en su extremo amino (Samino y col. 2006).

1.1.1.3. Los transportadores TAP.

En general, los péptidos resultantes del procesamiento citosólico que no se degradan a aa son transportados al lumen del RE por los transportadores TAP. El RE es un compartimento mucho más especializado que el citosol en cuanto al procesamiento de antígeno, ya que muchos de los componentes de la vía de procesamiento de antígeno localizados en el RE están dedicados principal o exclusivamente a esta función, siendo algunos de ellos inducibles por IFN γ (como es el caso de las moléculas de MHC de clase I, TAP, y tapasina).

TAP es una molécula transportadora formada por un heterodímero de dos proteínas homólogas denominadas TAP1 y TAP2 que forman un poro a través del cual el péptido es transportado. TAP pertenece a la familia de transportadores ABC con dominios de unión a ATP (*ATP-binding cassette*), por lo que se requiere la energía de hidrólisis del ATP para la translocación del péptido al RE (Neejfs y col. 1993; Shepherd y col. 1993). TAP transloca péptidos con un tamaño adecuado para la unión a moléculas de MHC de clase I, prefiere péptidos de 9-16 aa (van Endert y col. 1994), aunque puede transportar con menor eficiencia péptidos mayores de hasta 40 aa (Koopmann y col. 1996). Además, TAP y las moléculas de MHC de clase I coinciden en transportar o unir péptidos con extremos amino y carboxilo libres, y en la preferencia por el residuo del extremo carboxilo. TAP puede incluso translocar péptidos glicosilados o fosforilados (Andersen y col. 1999; Haurum y col. 1999). La especificidad de sustrato de TAP es amplia ya que tiene que alimentar diferentes alotipos de MHC de clase I con péptidos. Los péptidos se seleccionan en función de las 3 primeras posiciones del extremo amino y la posición del extremo carboxilo, siendo la afinidad el resultado de los efectos de las 4 posiciones (van Endert y col. 1995; Peters y col. 2003). En

concreto péptidos con P en posición 2 son desfavorables y se transportan mal por TAP (Neefjes y col. 1995).

1.1.1.4. Aminopeptidasas de RE asociadas al procesamiento de antígeno.

Diferentes estudios indican que en el RE puede ocurrir cierto grado de procesamiento de antígeno, y han sido reseñados (Rock y col. 2004; Saveanu y col. 2005a). La capacidad de procesar péptidos antigénicos en el RE se limita a la eliminación de residuos flanqueantes en el extremo amino del péptido antigénico, ya que la actividad carboxipeptidasa está ausente en el RE (Powis y col. 1996; Snyder y col. 1998) además de en citosol (Reits y col. 2003). Esto es consistente con la capacidad de TAP para unir y translocar péptidos de un tamaño superior al que normalmente está asociado a las moléculas de MHC de clase I, y con la concordancia entre la especificidad de TAP y de las moléculas de MHC de clase I por similares residuos en el extremo carboxilo.

La aminopeptidasa de RE responsable del recorte aminoterminal de los precursores peptídicos transportados por TAP se ha denominado aminopeptidasa de RE asociada al procesamiento de antígeno, ERAAP en ratón (Serwold y col. 2002) o ERAP1 en el ser humano (Saric y col. 2002; York y col. 2002). Es una metalopeptidasa de expresión ubicua, residente en el RE e inducible por IFN γ . Digestiones *in vitro* indican una preferencia de ERAP1 por sustratos peptídicos de 9-16 residuos, mientras que péptidos de 8-9 aa son sustratos muy pobres (Saric y col. 2002; York y col. 2002; Chang y col. 2005). Estos resultados sugieren que estas aminopeptidasas de RE han evolucionado para generar péptidos del tamaño adecuado para la unión a moléculas de MHC de clase I. Además se ha identificado en el ser humano, pero no en ratón, una aminopeptidasa residente en RE con un 50% de homología en secuencia de aa a ERAP1 denominada L-RAP (Tanioka y col. 2003) o ERAP2 (Saveanu y col. 2005b). Se induce por IFN γ si bien la expresión está mas restringida que en el caso de ERAP1.

Diferentes estudios han demostrado la contribución de ERAAP o ERAP1 tanto en la generación como en la destrucción de distintos epítomos para su presentación por MHC de clase I a CTL (Serwold y col. 2001; Serwold y col. 2002; York y col. 2002; Hammer y col. 2006). En cuanto a la especificidad, pueden eliminar una variedad de aa del extremo amino, excepto P en posición 2 (Serwold y col. 2002). Así al no poder recortarse, los péptidos con P en 2 se acumulan en el RE explicando la paradoja del uso preferente de P en 2 como motivo de anclaje de un porcentaje considerable de alotipos de MHC de clase I, a pesar de la incapacidad de TAP de transportar estos péptidos (Serwold y col. 2001). De este modo el recorte en el RE cobra mayor relevancia ya que estos péptidos son translocados por TAP gracias a extensiones en el extremo amino que desplazan la P en 2 a posiciones no tan desfavorables para el transporte. Por otra parte, digestiones *in vitro* con sustratos sintéticos

indican una cierta preferencia de ERAP1 por aa grandes hidrofóbicos como L (Saveanu y col. 2005b), y de ERAP2 por aa básicos como R o K (Tanioka y col. 2003). Además, recientemente se ha documentado una preferencia de ERAP1 (y no de ERAP2) por péptidos con el extremo carboxilo hidrofóbico (Chang y col. 2005).

1.1.1.5. Las moléculas de MHC de clase I.

La molécula de MHC de clase I une péptidos cortos de 8-10 aa y se compone de una cadena pesada (glicoproteína transmembrana) asociada no covalentemente con la proteína β_2m . La cadena pesada está codificada en el complejo génico altamente polimórfico del MHC, llamado HLA en el ser humano y H-2 en ratón. En el ser humano hay tres loci denominados HLA-A, B y C, pudiendo expresar un individuo hasta 6 alelos. En ratón los loci se denominan H-2K, D y L, y las cepas de laboratorio homocigotas tienen 2 ó 3 alelos. La cadena pesada consta de tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) seguidos por un único dominio transmembrana y una cola citoplásmica relativamente corta. El dominio $\alpha 3$ interacciona con β_2m , mientras que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ forman una cavidad hidrofóbica longitudinal donde se une el péptido.

El péptido se une a la cavidad de unión de la molécula de MHC de clase I gracias a dos tipos de interacciones. Los grupos químicos amino y carboxilo extremos del péptido interaccionan con residuos de la cavidad de unión altamente conservados entre alotipos de MHC, por lo que el tamaño de los péptidos unidos suele ser similar. Además en la cavidad de unión hay dos (o menos frecuentemente tres) subcavidades con preferencias por entre 1 y 5 (normalmente son una o dos) cadenas laterales posibles de los 20 aa naturales. El polimorfismo de los alotipos de MHC de clase I se concentra en estas subcavidades, y como resultado diferentes alotipos de MHC de clase I unen diferentes péptidos (Groothuis y col. 2005). Gracias a la secuenciación del conjunto de péptidos asociados a cada alotipo de MHC de clase I se conocen los residuos de anclaje a diferentes alotipos de MHC de clase I, que normalmente son dos, situados en las posiciones 2-5 y en la última posición del péptido. Esta información se puede utilizar para predecir en un determinado antígeno posibles epítomos presentados por un alotipo de MHC de clase I a CTL. Los motivos de anclaje para la mayoría de alotipos de MHC de clase I humanos y de ratón se pueden consultar en <http://www.syfpeithi.de> (Rammensee y col. 1999).

1.1.1.6. El complejo de carga de MHC de clase I.

Antes de la unión de péptidos, las cadenas pesadas de MHC de clase I recién sintetizadas son retenidas en el RE mediante interacciones con chaperonas moleculares, constituyendo un complejo multimérico que facilita el suministro de péptidos al RE y su unión a MHC de clase I. Inicialmente las cadenas pesadas de MHC de clase I se unen a calnexina,

que se disocia al unirse la proteína β_2m , iniciándose el ensamblaje del complejo de carga de MHC de clase I. Este complejo consta de varias proteínas: el dímero TAP1/TAP2, cuatro moléculas de tapasina, cuatro moléculas de MHC de clase I sin péptido, y cuatro moléculas de las chaperonas ERp57 y calreticulina. Tapasina es un componente esencial del complejo de carga ya que estabiliza el heterodímero TAP1/TAP2 al mismo tiempo que hace de puente entre TAP y las moléculas de MHC de clase I. Además, tapasina facilita la unión del péptido a las moléculas de MHC de clase I contribuyendo a optimizar el repertorio peptídico. No obstante, en ausencia de tapasina o de TAP, las moléculas de MHC de clase I presentan su carga en la membrana plasmática (Garbi y col. 2005).

El péptido es un componente crítico para que el complejo cargado se libere de las chaperonas de RE y de TAP para poder salir del RE y ser exportado a la superficie celular. La optimización de la carga mediante intercambio de péptidos hasta unir un péptido con suficiente afinidad permite el ensamblaje estable de un complejo MHC/péptido (Elliot y Williams 2005). A pesar de ello hay moléculas de MHC de clase I que pueden salir del RE subóptimamente cargadas y pueden mejorar la carga en otros compartimentos de la vía secretoria o incluso en la superficie celular.

La probabilidad de que un péptido sobreviva a los numerosos ataques proteolíticos y se una con éxito a una molécula de MHC de clase I es baja, tal y como han demostrado diferentes estudios en los que se ha cuantificado la eficiencia del procesamiento de antígeno (Montoya y Del Val 1999; Princiotta y col. 2003; Yewdell y col. 2003). La elevada sensibilidad del reconocimiento por CTL del complejo MHC/péptido en la superficie celular explica cómo una tan baja eficiencia en el procesamiento de antígeno puede ser compatible con una respuesta inmune celular eficiente.

Los péptidos no unidos a moléculas de MHC de clase I deben abandonar el RE y volver al citosol donde pueden ser degradados, o incluso ser recortados y transportados por TAP otra vez al RE. El translocón se usa para la importación de las proteínas sintetizadas en los ribosomas asociados a membranas del RE, y también parece ser el aparato de retrotranslocación usado para la degradación de proteínas asociada al RE (Meacock y col. 2000). Además, el translocón parece ser el canal de salida de péptidos del RE al citosol (Koopmann y col. 2000).

1.1.2. Vías alternativas de presentación de antígeno por MHC de clase I a CTL.

Existen evidencias de la generación de epítomos por vías alternativas a la vía convencional de procesamiento de antígeno por MHC de clase I, en las que participan proteasas diferentes (Del Val y López 2002). Así se ha documentado la generación de epítomos de forma independiente de proteasoma y dependiente de TAP mediada por

cisteínproteasas (López y Del Val 1997) o por la TPPII (Seifert y col. 2003). Además, se han descrito vías alternativas de procesamiento y presentación de antígeno que permiten suministrar péptidos a moléculas de MHC de clase I para su presentación a CTL de forma independiente de TAP (**Tabla I**). La relevancia de estas vías independientes de TAP se pone de manifiesto si tenemos en cuenta que pacientes con el síndrome de deficiencia de TAP no suelen ser particularmente susceptibles a infecciones virales y generan CTL específicos de epítomos virales (Gadola y col. 2000).

El mecanismo por el cual antígenos endógenos pueden ser procesados y presentados independientemente de TAP incluye la liberación de péptidos por la endoproteasa peptidasa señal en el RE (Henderson y col. 1992; Wei y Cresswell 1992), la liberación de epítomos de proteínas asociadas o no a membranas en el RE por la acción de endoproteasas no definidas (Hammond y col. 1993; Hammond y col. 1995; Elliot y col. 1995; Snyder y col. 1998), o la liberación de péptidos de proteínas que maduran por la endoproteasa furina de la red del *trans*-Golgi (TGN) (Gil-Torregrosa y col. 1998; Gil-Torregrosa y col. 2000). Además, se ha descrito la entrada al RE por mecanismos desconocidos de péptidos codificados en plásmidos (Zweerink y col. 1993), de péptidos pertenecientes a proteínas citosólicas (Hammond y col. 1995; Snyder y col. 1997), o de péptidos hidrofóbicos de proteínas transmembrana generados por el proteasoma (Lautscham y col. 2001). En la mayoría de estos casos de presentación independiente de TAP, la carga de MHC de clase I con péptido se cree que ocurre en el sitio canónico, el RE. Este tipo de presentación es sensible a brefeldina A (BFA), inhibidor del transporte anterógrado en la vía secretoria endógena (Lippincott-Schwartz y col. 1990).

Sin embargo, en compartimentos endosomales también se ha descrito la existencia de presentación independiente de TAP de antígenos endógenos, como es el caso de un antígeno cuya presentación independiente de TAP correlaciona con la asociación a una chaperona (Schirmbeck y Reimann 1994), o de proteínas de paramixovirus como la proteína F del virus del sarampión (Grommé y col. 1999) y las proteínas N de la nucleocápsida de los virus del sarampión y del moquillo (Neumeister y col. 2001). En estos casos la presentación probablemente implica la participación de proteasas de compartimentos endosomales, ya que la carga de MHC de clase I con péptido puede darse en estos compartimentos donde ocurre el reciclaje de moléculas de MHC de clase I (Schirmbeck y Reimann 2002).

Tabla I. Mecanismos independientes de TAP de procesamiento de antígeno para su presentación por MHC de clase I a CTL. Resumen bibliográfico de trabajos realizados en la línea celular T2 deficiente en TAP, excepto las referencias precedidas de un asterisco (*) que utilizan la línea celular RMA/S deficiente en TAP. Además del mecanismo de presentación se indica la resistencia o sensibilidad a BFA, demostrada sólo en algunos de los trabajos para cada mecanismo.

Mecanismo de presentación independiente de TAP (BFA ^{SR})	Proteasa ^a	Localización subcelular ^b	Tipo de antígeno	Vehículo antigénico ^c	Referencia
Liberación por la peptidasa señal de péptidos pertenecientes a la secuencia señal de proteínas que entran al RE. (BFA ^S)	Peptidasa señal +AminoP +CarboxiP	RE	Endógeno		Wei y Cresswell 1992; Henderson y col. 1992.
Liberación por la peptidasa señal de péptidos insertados en toxinas que acceden al citosol por transporte retrógrado. (BFA ^S)	Peptidasa señal +CarboxiP	RE pre-Golgi	Exógeno	Toxina Ricina	*Smith y col. 2002a.
Liberación de péptidos por endoproteasas no definidas de la vía secretoria. (BFA ^S)	EndoP	RE	Endógeno	rVV y VIH	Hammond y col. 1993; Hammond y col. 1995.
	EndoP +AminoP +CarboxiP	RE o pre-Golgi		rVV	Elliot y col. 1995.
	EndoP	RE		rVV	Snyder y col. 1998.
Liberación de péptidos por la endoproteasa furina. (BFA ^{SR})	Furina +AminoP +CarboxiP	post-RE, TGN.	Endógeno	rVV	Gil-Torregrosa y col. 1998; Gil-Torregrosa y col. 2000.
	Furina +CarboxiP	RE/TGN	Exógeno	Péptido	Lu y col. 2001; Lu y col. 2004.
Entrada de péptidos al RE por mecanismos desconocidos. (BFA ^S)		citosol	Endógeno	Plásmido	Zweerink y col. 1993.
		citosol		rVV	Hammond y col. 1995.
	Proteasa citosólica	citosol		rVV	Snyder y col. 1997.
	Proteasoma	citosol		rVV y EBV	Lautscham y col. 2001.
Liberación de péptidos en compartimentos acídicos endosomales. (BFA ^R)		endosomas	Endógeno	Plásmido	*Schirmbeck y Reimann 1994.
				MV	Grommé y col. 1999.
				MV y CDV	Neumeister y col. 2001.
			Exógeno	Toxina <i>Pseudomonas</i>	Ulmer y col. 1994.
				Proteína purificada	Blake y col. 1997.
				SV inactivado	Zhou y col. 1993; Liu y col. 1995.

^aCuando no se ha identificado la proteasa concreta se indica el tipo de proteasa implicada. EndoP: endoproteasa. En algunos casos se requiere la acción adicional de carboxipeptidasas (CarboxiP) o aminopeptidasas (AminoP). Las celdas en blanco corresponden a trabajos en los que no se ha concluido el tipo de proteasa implicada.

^bSe indica la localización subcelular del antígeno o proteasa implicada en su procesamiento.

^cSe indica el vector utilizado para expresar el antígeno, excepto en el caso de antígenos añadidos exógenamente. Las celdas en blanco corresponden a trabajos en los que se estudiaron péptidos endógenos asociados a MHC de clase I. VIH (virus de inmunodeficiencia humana), EBV (virus de Epstein-Barr), MV (virus del sarampión), CDV (virus del moquillo), SV (virus Sendai).

Si bien los péptidos presentados por moléculas de MHC de clase I suelen resultar del procesamiento de antígenos endógenos, también pueden resultar del procesamiento de antígenos exógenos y ser presentados de forma independiente de TAP. En estos casos las proteasas implicadas pueden ser también la peptidasa señal que permite la presentación de epítopos fusionados a la citotoxina ricina (Smith y col. 2002a), o la furina implicada en la presentación de los denominados péptidos troyanos (Lu y col. 2001; Lu y col. 2004). Proteasas de compartimentos endosomales parecen estar implicadas en la presentación independiente de TAP de un epítipo fusionado a la exotoxina A de *Pseudomonas* (Ulmer y col. 1994), o de la proteína viral EBNA1 cuya repetición rica en G-A impide su procesamiento endógeno (Blake y col. 1997). Estas vías de presentación independiente de TAP son incluso accesibles a formas no infectivas de virus, ya que se ha descrito la presentación independiente de TAP y resistente a BFA del virus Sendai inactivado (Zhou y col. 1993; Liu y col. 1995).

1.1.3. Activación de linfocitos T CD8⁺.

Las células presentadoras de antígeno profesionales (pAPC), principalmente células dendríticas, son críticas en la iniciación de la respuesta inmune a virus, ya que muestrean los tejidos periféricos capturando antígenos potenciales y los transfieren a los ganglios linfáticos donde se encuentran los linfocitos T CD8⁺ vírgenes. Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes se activan (*"priming"*) tras la interacción a través de su TCR con una molécula de MHC de clase I presentando un epítipo viral en la superficie de una pAPC. El epítipo viral presentado resulta del procesamiento endógeno del antígeno viral. Sin embargo, las pAPC tienen además la capacidad de realizar presentación cruzada (*"cross-presentation"*): incorporar antígenos de los restos de células infectadas circundantes e introducirlos en su vía de procesamiento endógena para presentación por MHC de clase I. La estimulación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes por pAPC mediante presentación cruzada se denomina activación cruzada (*"cross-priming"*), y tiene relevancia en circunstancias en las que por ejemplo un virus no infecta pAPC (Yewdell y Haeryfar 2005; Trombetta y Mellman 2005).

1.1.3.1. Vías de presentación cruzada para la activación de linfocitos T CD8⁺.

Hay poca información sobre las proteasas implicadas en la presentación cruzada pero en general se acepta la existencia de dos vías: una vía de fagosoma o endosoma a citosol dependiente de TAP, y una vía endosomal independiente de TAP y de proteasas citosólicas.

En la vía de presentación cruzada dependiente de TAP los antígenos exógenos una vez endocitados pueden llegar al citosol por dos mecanismos diferentes dependiendo del antígeno. En el primer caso, antígenos particulados son adquiridos por endocitosis e

incorporados a fagosomas que contienen membranas del RE, disponiendo de la maquinaria para la salida del antígeno a citosol. En el segundo caso, antígenos solubles son endocitados por macropinocitosis o endocitosis mediada por receptor, llegando al RE por transporte retrógrado para salir al citosol siguiendo la vía de degradación asociada al RE. En ambos casos, una vez en el citosol el antígeno puede entrar a la vía clásica de procesamiento y presentación por MHC de clase I. La carga de MHC con péptido ocurre en el sitio canónico, el RE, siendo este tipo de presentación cruzada sensible a BFA (Ackerman y Cresswell 2004; Cresswell y col. 2005).

En la vía de presentación cruzada endosomal independiente de TAP, proteasas lisosomales o endosomales como la cathepsina S pueden degradar las proteínas internalizadas a péptidos (Shen y col. 2004), o bien los péptidos podrían adquirirse ya procesados entrando asociados a chaperonas (Reed y Nicchitta 2000). Esta vía de presentación cruzada es resistente a BFA, pudiendo las moléculas de MHC de clase I intercambiar péptidos en compartimentos ácidos, como endosomas o compartimentos de MHC de clase II (Grommé y col. 1999). Teniendo en cuenta que las reglas para la generación de péptidos en el citosol y en endosomas pueden no ser idénticas, la estimulación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes por la vía de presentación cruzada endosomal sólo tiene relevancia si luego las células infectadas por el virus son capaces de generar el mismo péptido.

1.1.3.2. CTL efectores y de memoria.

Tras la activación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes, ya sea por activación directa o cruzada, tiene lugar una expansión clonal favorecida por la interleuquina 2 (IL2), generándose un elevado número de CTL efectores que salen del ganglio linfático para migrar a los sitios de infección donde se encargan de eliminar las células infectadas. Se conocen dos mecanismos por los cuales los CTL activados inducen la apoptosis en las células infectadas diana (Barry y Bleackley 2002). Uno implica la liberación de gránulos secretorios por parte del CTL induciendo la formación de poros en la membrana de la célula diana por acción de la proteína perforina, y la entrada de unas serínproteasas llamadas granzimas, que inducen la apoptosis en la célula infectada. La otra vía citotóxica depende de la interacción entre el ligando de Fas (FasL) que existe en la superficie del CTL y el receptor Fas presente en la superficie de la célula presentadora.

Después de la eliminación de las células infectadas y la reducción de los niveles de IL2, los CTL se eliminan mediante apoptosis, y queda únicamente una población de CTL de memoria. La respuesta secundaria a una infección viral gracias a los CTL de memoria es una respuesta más rápida y efectiva que la respuesta primaria, debido a la optimización en estos linfocitos de la adhesión a las dianas y de sus capacidades funcionales. Por lo tanto el

establecimiento de una población de CTL de memoria permite la existencia de inmunidad protectora contra reinfecciones virales.

1.1.4. Inmunodominancia.

Una característica central en la respuesta antiviral mediada por CTL es la inmunodominancia: de los cientos de péptidos virales que pueden presentarse potencialmente a CTL, sólo una pequeña fracción induce respuestas detectables en asociación con un determinado alotipo de MHC de clase I. Además entre éstos, las respuestas suelen estar dirigidas principalmente a uno o varios epítomos denominados inmunodominantes a expensas de las respuestas a otros epítomos denominados subdominantes (Yewdell y Bennink 1999; Yewdell y Del Val 2004).

Los propios virus han desarrollado mecanismos para interferir en la vía de presentación por MHC de clase I (Petersen y col. 2003), en cuyo caso las respuestas se centrarán en aquellos epítomos que por cualquier razón resulten menos afectados por la estrategia empleada por el virus. La inmunodominancia por tanto resulta de la compleja interacción de varios factores incluyendo la eficacia de procesamiento del antígeno, la afinidad de los epítomos por las moléculas de MHC de clase I, la estabilidad y la cantidad de complejos MHC/péptido expresados en las células presentadoras, el repertorio de linfocitos T CD8⁺ que esperan a los complejos, y la inmunodominación o capacidad de los linfocitos T CD8⁺ específicos de epítomos inmunodominantes de suprimir respuestas específicas de epítomos subdominantes. La contribución de cada uno de estos factores a la inmunodominancia varía considerablemente dependiendo del epítomo y del alotipo de MHC de clase I (Chen y col. 2000).

1.2. EL VIRUS VACCINIA EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR.

1.2.1. El virus vaccinia y su ciclo de replicación.

El virus vaccinia parece ser un híbrido o superviviente de laboratorio de un virus que no se conoce en la naturaleza, y pertenece al mismo género que el virus causante de la viruela antes de su erradicación. Vaccinia es el miembro prototipo del género *Orthopoxvirus* de la familia *Poxviridae* que se caracteriza por realizar su ciclo infectivo en el citosol. La partícula viral consiste en una envuelta lipoproteica que rodea una compleja estructura o nucleóide, donde se encuentra el genoma (una molécula de ADN de doble cadena de

aproximadamente 200.000 pares de bases) junto a enzimas codificadas por el virus que comprenden un aparato transcripcional completo (Moss 2001).

La infección con vaccinia en general resulta en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas de la célula huésped. El ciclo de replicación viral se inicia con la fusión del virión con la membrana celular y la penetración del nucleoide en el citosol. Existen tres tipos de genes: tempranos, intermedios y tardíos. Cada tipo temporal de gen tiene secuencias promotoras únicas que son reconocidas por factores proteicos específicos, lo cual estructura un mecanismo programado de expresión génica en cascada (Moss y col. 1991). La replicación del ADN comienza unas horas después de la infección y conduce sucesivamente a fases intermedias y tardías de expresión génica. Una vez sintetizadas las proteínas estructurales tardías, el virión se ensambla cubriéndose de membranas provenientes del compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi formando el virus inmaduro (Risco y col. 2002). Éste sufre diversos cambios estructurales y bioquímicos que dan lugar al virus maduro intracelular que constituye la mayor parte de las partículas infecciosas, algunas de las cuales se rodean de membranas de las cisternas del TGN, dando lugar a los virus intracelulares con envuelta (Schmelz y col. 1994). Estas partículas son transportadas a la superficie de la célula donde la membrana externa del virus se fusiona con la membrana celular, liberándose los virus extracelulares con envuelta, mientras que otros quedan anclados a la superficie celular. Ambas formas son responsables de la transmisión del virus a otras células. En el caso de la cepa WR (Western Reserve) utilizada en este trabajo la mayoría de las partículas (>95%) permanecen asociadas a la célula.

1.2.2. Los virus vaccinia recombinantes (rVV) en el estudio de la respuesta inmune celular.

El virus vaccinia es un vector excepcional al tener una enorme capacidad en su genoma para albergar insertos grandes de ADN extraño manteniendo la infectividad. Por naturaleza son partículas infectivas, siendo ésta una de sus ventajas, puesto que las proteínas cuyos genes codifican se van a expresar en el citosol de la célula, facilitando su procesamiento y presentación al sistema inmune. Otras ventajas de la utilización de rVV como vectores son su capacidad para infectar un elevado número de tipos celulares y alcanzar niveles elevados de síntesis proteica. Además permite que ocurran modificaciones post-traduccionales, procesamiento, secreción y transporte acordes con la estructura primaria de la proteína expresada y el tipo celular (Moss 1996).

Los rVV se utilizan ampliamente para inducir CTL específicos en animales y para generar dianas reconocidas por CTL *in vitro*. Hay algunas evidencias de que el virus vaccinia puede disminuir la presentación de antígeno por MHC de clase I en etapas tardías de la

infección (Coupar y col. 1986), y por lo tanto se recomienda el uso de promotores tempranos o tempranos/tardíos para la inducción de CTL o preparación de dianas para CTL. Estos promotores permiten además que la expresión de la proteína de interés ocurra antes de que se inicien los mayores efectos citopáticos.

Los rVV han sido importantes en estudios inmunológicos ya que se han utilizado para infectar animales con objeto de determinar respuestas mediadas por células o respuestas humorales a proteínas específicas. Existe un gran número de ejemplos en los que la inmunización de animales con rVV que expresan antígenos de otros patógenos virales ha proporcionado una protección total o parcial contra la infección. Además se han diseñado rVV que expresan antígenos de otros patógenos o antígenos celulares asociados a tumores que también han demostrado tener propiedades profilácticas y efectos terapéuticos (Moss 1996).

1.3. EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO Y SU PROTEÍNA DE FUSIÓN.

1.3.1. Características del virus respiratorio sincital (VRS).

El virus respiratorio sincital (VRS) pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y se clasifica en el género *Pneumovirus*. Los aislados de VRS humano se han clasificado en dos grupos antigénicos, A y B, atendiendo a su secuencia y a la reactividad con anticuerpos monoclonales (mAbs). El trabajo experimental con VRS humano descrito en la literatura científica se ha realizado fundamentalmente con las cepas A2 y Long del grupo A.

El genoma de VRS es una molécula de ARN, de polaridad negativa y aproximadamente 15.000 pares de bases, que codifica 11 proteínas. Se transcribe en 10 ARNm subgenómicos, cada uno con un marco abierto de lectura, a excepción del gen M2 que da lugar a dos proteínas, M2-1 y M2-2. La transcripción se realiza de forma secuencial a partir de un único promotor de modo que los genes más próximos a él se transcriben con más frecuencia que los genes más alejados. El virión consta de una nucleocápsida helicoidal recubierta por una envuelta lipoproteica que el virus adquiere al salir de la célula hospedadora por gemación. La envuelta viral incluye tres tipos de glicoproteínas virales: la proteína de unión al receptor o proteína G, la proteína de fusión o proteína F, y la proteína pequeña hidrofóbica o proteína SH. Estas tres glicoproteínas se organizan por separado en espículas virales. La proteína de matriz M codificada por el virus parece formar la capa interna de la envuelta viral. Hay cuatro proteínas virales empaquetadas junto al genoma en la nucleocápsida del virión: la nucleoproteína N (proteína mayoritaria de la nucleocápsida), la fosfoproteína P, el factor antiterminador de la transcripción (M2-1 ó 22K), y la subunidad

grande de la polimerasa viral (L). El genoma de VRS codifica además la proteína M2-2 que parece ser un regulador de ARN, y las proteínas no estructurales NS-1 y NS-2 (Collins y col. 2001). Las proteínas de VRS necesarias como requerimiento mínimo para el empaquetamiento y transmisión de un minigenoma son las proteínas N, P, M y F, si bien la eficiencia aumenta al añadir las proteínas G y L (Teng y Collins 1998).

1.3.1.1. La proteína F de VRS.

La proteína F de VRS media la fusión de las membranas viral y celular, permitiendo así la liberación de la nucleocápsida viral en el citosol de la célula hospedadora. Es una proteína integral de membrana tipo I ya que retiene su extremo carboxilo en el citosol, y se sintetiza como un precursor de 574 aa denominado F0. Existen tres regiones hidrofóbicas en F0: la secuencia señal del extremo amino que permite la inserción de la proteína en el RE, tras lo cual es eliminada; una región transmembrana en el extremo carboxilo del precursor que permite el anclaje de la proteína a la membrana celular, y que está seguida de una cola citosólica; y una región hidrofóbica de unos 20 aa (en la posición 137) conocida como péptido de fusión, que desempeña un papel fundamental en el proceso de fusión de membranas. Adyacentes al péptido de fusión y a la región transmembrana se encuentran dos regiones con secuencias heptádicas repetidas denominadas HRA y HRB, que parecen contribuir a la estabilidad estructural de la proteína (Zhao y col. 2000).

La proteína F de VRS es una glicoproteína, así el precursor F0 es *N*-glicosilado en el RE, lo cual es necesario para su transporte a la superficie celular (Sugrue y col. 2001). Además, la proteína F0 se oligomeriza en el RE y es procesada proteolíticamente a partir del TGN (Collins y Mottet 1991) por la proteasa furina (Bolt y col. 2000). Estudios estructurales apoyan la oligomerización de la proteína F en trímeros (Calder y col. 2000). El procesamiento proteolítico por furina tiene lugar de forma independiente en dos sitios de corte (109 y 136), siendo necesario el corte en ambos sitios para que la proteína sea activa en la fusión de membranas (González-Reyes y col. 2001; Zimmer y col. 2001). El doble procesamiento proteolítico de la proteína F de VRS es único entre los paramixovirus cuyas proteínas de fusión sólo tienen un sitio de procesamiento. Como resultado del procesamiento de F0 se generan dos cadenas, F1 y F2, que permanecen unidas por al menos un puente disulfuro. La cadena de mayor tamaño F1 aloja el péptido de fusión y la región transmembrana, y contiene varios sitios antigénicos para anticuerpos neutralizantes (López y col. 1998). La cadena F2, en el extremo amino, ha sido descrita como responsable de la especificidad de especie de VRS (Schlender y col. 2003), y contiene dos epítomos de CTL murinos restringidos por H-2K^d, F85-93 y F92-106 (Chang y col. 2001; Jiang y col. 2002). La **Figura 2** muestra un esquema de la estructura primaria de la proteína F de VRS.

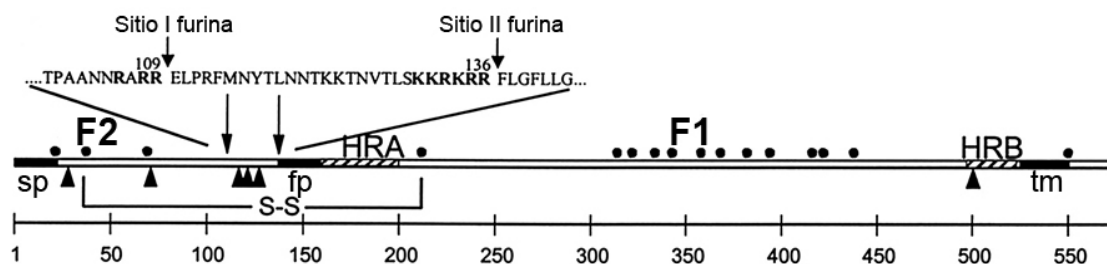


Figura 2. Diagrama de la estructura primaria de la proteína F de VRS. Se indican las regiones hidrofóbicas (—) correspondientes al péptido señal (sp), péptido de fusión (fp), y región transmembrana (tm). En una porción de la secuencia de aa de la proteína F se indican los sitios I y II reconocidos por proteasas tipo furina, cuya acción proteolítica rinde las subunidades F1 y F2 que permanecen unidas entre sí por un puente disulfuro. Además se indican residuos de cisteínas (•), sitios potenciales de glicosilación (▲), y regiones heptádicas (HRA y HRB). Adaptado (González-Reyes y col. 2001).

1.3.2. Patología causada por la infección con VRS humano.

El VRS humano es una de las mayores causas de infección del tracto respiratorio inferior en neonatos y niños, afectando también a pacientes inmunocomprometidos y a ancianos, siendo común la reinfección. Es un virus ampliamente difundido que infecta a la totalidad de los niños en sus primeros 2 años de vida. Es muy contagioso y se transmite mayormente por la dispersión de secreciones respiratorias. El VRS humano causa epidemias anuales durante el invierno y principios de primavera en zonas de clima templado, y en los meses de lluvia en zonas de clima tropical (Simoes 1999).

La infección grave con VRS humano se presenta típicamente como una bronquiolitis viral que puede requerir hospitalización. En Europa se estima que casi la mitad de las hospitalizaciones de niños menores de 2 años por infección del tracto respiratorio inferior se deben a VRS (Simoes y Carbonell-Estrany 2003). Se ha descrito una asociación en los neonatos que han padecido bronquiolitis viral por VRS con la susceptibilidad al desarrollo o agravamiento de episodios asmáticos durante la niñez y la adolescencia (Stein y col. 1999).

No existe ningún tratamiento eficaz contra la patología causada por VRS humano, si bien como medida profiláctica en pacientes de riesgo se administra un mAb humanizado y neutralizante dirigido contra la proteína F que atenúa la gravedad de la patología (Johnson y col. 1999). En cuanto al diseño de una vacuna, los primeros intentos de vacunación se llevaron a cabo en los años 60 con virus inactivado con formalina y fracasaron. Después de la infección natural con VRS, los individuos vacunados desarrollaron una enfermedad más grave caracterizada por una infiltración masiva de los pulmones por eosinófilos, que no ocurría en los individuos no vacunados (Kim y col. 1969). El diseño de una vacuna eficaz contra VRS debe hacer frente a la inmadurez del sistema inmune en la principal población objeto de vacunación (neonatos o niños de menos de un año) y a los mecanismos de desregulación del sistema inmune que emplea el virus.

1.3.3. Respuesta inmune a la infección con VRS humano.

Algunas proteínas de VRS pueden interferir con la respuesta inmune temprana a la infección de células epiteliales pulmonares con VRS. Se ha sugerido que la proteína G es un análogo estructural de la quimioquina fractalquina y que puede interactuar con su receptor, CX3CR1 (Tripp y col. 2001). La proteína F interactúa con el receptor "Toll-like" TLR-4 (Kurt-Jones y col. 2000), aunque esta interacción no parece desempeñar un papel importante *in vivo* (Ehl y col. 2004). Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 actúan como antagonistas en la respuesta antiviral mediada por interferones tipo I (Schlender y col. 2000). No obstante, como consecuencia de la infección del epitelio pulmonar con VRS se secretan una serie de mediadores inflamatorios que activan una respuesta de linfocitos T CD4⁺ de tipo Th1 en la que predomina la producción de IFN γ . Numerosos estudios han demostrado que en los individuos vacunados en los años 60, la enfermedad agravada después de la infección natural con VRS se debió a la inducción de una respuesta de linfocitos T CD4⁺ de tipo Th2, que secretaban predominantemente IL-4 e IL-5 (Openshaw y Tregoning 2005).

1.3.3.1. Papel de los CTL en la respuesta inmune a VRS humano.

En la respuesta inmune a la infección con VRS la protección está mediada principalmente por anticuerpos neutralizantes frente a las dos glicoproteínas de superficie del virión, mientras que la eliminación de células infectadas con el virus requiere linfocitos T CD8⁺. Estudios en el modelo de infección del ratón con VRS humano han demostrado que los linfocitos T CD8⁺ juegan un papel tanto en la eliminación del virus como en la patología pulmonar (Cannon y col. 1988; Graham y col. 1991). Linfocitos T CD8⁺ específicos del epítipo M2₈₂₋₉₀ de la proteína M2-1 son los únicos mediadores de la resistencia a la infección por VRS en ratones BALB/c infectados con un rVV que expresa dicha proteína (Kulkarni y col. 1995). Diferentes estudios indican que los linfocitos T CD8⁺ regulan la respuesta de linfocitos T CD4⁺ Th2, activándola o inhibiéndola en función del sistema modelo utilizado. Por una parte, durante la infección primaria con VRS, los linfocitos T CD8⁺ parecen estar implicados en la eosinofilia pulmonar en modelos de sensibilización alérgica de las vías aéreas (Schwarze y col. 1999a; Schwarze y col. 1999b). Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ inhiben la diferenciación y activación de linfocitos T CD4⁺ Th2, inductores de la eosinofilia pulmonar característica de la patología causada por la infección con VRS en animales vacunados con el virus inactivado con formalina o con un rVV que codifica la proteína G (Srikiatkachorn y Braciale 1997; Hussell y col. 1997). Además, la infección con VRS altera la actividad efectora y de memoria de linfocitos T CD8⁺ selectivamente en los pulmones (Chang y Braciale 2002; Chang y col. 2001). Se ha sugerido que esta desregulación inmune

de los linfocitos T CD8⁺ específicos del virus inducida por VRS podría ser el origen de la ausencia de inmunidad duradera frente a la infección (Chang y Braciale 2002).

A pesar del papel negativo de la respuesta inmune en la patología causada por VRS, el que VRS afecte más severamente a pacientes inmunocomprometidos destaca el papel positivo de la respuesta inmune en la eliminación del virus. Así se ha visto en ratones inmunodeficientes que los daños pulmonares causados por la infección persistente con VRS pueden evitarse con la eliminación del virus por linfocitos T transferidos adoptivamente (Cannon y col. 1987).

1.3.3.2. Papel de la proteína F en la respuesta inmune a VRS humano.

La proteína F de VRS humano es reconocida como una de las principales candidatas en la elaboración de vacunas, ya que es una diana antigénica importante para CTL específicos del virus (Pemberton y col. 1987) y para anticuerpos neutralizantes (Olmsted y col. 1986). Anticuerpos monoclonales frente a la proteína F, altamente conservada entre los dos grupos antigénicos de VRS humano, protegen pasivamente al ratón frente a un desafío con VRS (Taylor y col. 1984) y reducen la gravedad de la enfermedad en bebés prematuros y recién nacidos (The IMPact-RSV Study Group 1998). Además, la inmunización de ratones con rVV (Olmsted y col. 1986; Stott y col. 1987) o plásmidos de ADN codificando la proteína F (Bembridge y col. 2000; Li y col. 1998), que inducen anticuerpos y CTL específicos de la proteína F, confieren protección frente a un desafío con VRS de cualquier grupo antigénico.

Es evidente que los modelos murinos han permitido avanzar enormemente en el estudio de la inmunología de VRS, además de resultar imprescindibles en el desarrollo de vacunas eficaces y seguras frente a VRS. Así pues la identificación de nuevos epítomos de CTL murinos permitirá profundizar en el estudio del papel de la proteína F en la respuesta inmune a VRS mediada por CTL, abordando cuestiones como la inmunodominancia o el procesamiento antigénico.

2. Objetivos

Con objeto de estudiar la respuesta inmune frente a la proteína F del VRS mediada por CTL, en el modelo de ratón BALB/c, nos propusimos:

1. Generar *in vitro* líneas policlonales de CTL multiespecíficas y monoespecíficas de epítomos de la proteína F de la cepa Long del VRS, e investigar si los epítomos F85-93 y F92-106, descritos en la proteína F de la cepa A2 del VRS, también son presentados por K^d en la cepa Long.
2. Estudiar en la proteína F de la cepa Long del VRS si existen nuevos epítomos presentados por K^d y reconocidos por CTL.
3. Estudiar la respuesta de linfocitos T CD8⁺ frente a epítomos de la proteína F del VRS, tras la infección *in vivo* con VRS o con un virus vaccinia recombinante que codifica la proteína F del VRS.
4. Estudiar el procesamiento y presentación de epítomos de la proteína F del VRS presentados por K^d y, en concreto, investigar si hay presentación independiente de TAP.

3. Materiales y Métodos

3.1. REACTIVOS.

3.1.1. Medios de cultivo.

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco (Biowhittaker) suplementado con 4 mM de glutamina (Biowhittaker) y 10% de suero bovino fetal (SBF) (PAN).

RPMI 1640: medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (Biowhittaker) suplementado con 2 mM de glutamina, 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol (Merck), y 10% SBF para el cultivo de líneas celulares o 5% SBF inactivado para ensayos funcionales.

IMDM: medio Dulbecco modificado por Iscove (Sigma) suplementado con 8 mM de glutamina, 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol y 10% de SBF.

α -MEM: medio esencial mínimo α (Gibco) suplementado con glutamina 8 mM, 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina (Biowhittaker), 0,1 mg/mL de estreptomycin (Biowhittaker), 10 μ g/mL de kanamicina (Sigma), 2,5 μ g/mL de anfotericina (Sigma), y SBF inactivado al 10%.

Tripsina-EDTA: 0,25% de tripsina (Biowhittaker) y 0,02% de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (p/v) (Merck) en PBS. Se utilizó para subcultivar las células adherentes.

PBS: solución salina tamponada con fosfato, NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KCl 2,7 mM.

3.1.2. Productos químicos.

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos (metanol, etanol, etc.) fueron suministrados en su mayoría por Merck, así como la sacarosa y la seroalbúmina bovina (BSA) (fracción V).

El paraformaldehído fue suministrado por Electron Microscopy Sciences.

Sigma fue el proveedor del dimetilsulfóxido, el β -mercaptoetanol, el cristal violeta, la brefeldina A (BFA) y la mitomicina C.

En los ensayos de citotoxicidad se utilizó $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ suministrado por Amersham Pharmacia Biotech.

La lactacistina (LC) fue suministrada por E. J. Corey (Harvard University, Cambridge, MA, E.E.U.U.).

El leucíntiol (LeuSH) y la decanoil-peptidil-clorometilcetona (decRVKR-cmk) fueron suministrados por Bachem.

La interleuquina 2 (IL2) recombinante humana fue generosamente suministrada por el "NCI Preclinical Repository" de los Institutos Nacionales de la Salud de E.E.U.U.

El kit *IntraStain* para citometría fue suministrado por DakoCytomation.

3.1.3. Productos inmunoquímicos.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de rata conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD8 α murino fueron proporcionados por Becton Dickinson (clon 53-6.7) o ProImmune (clon KT15). Se utilizaron en el ensayo de tinción intracelular de citoquinas (ICS) diluidos 1/100 y 1/400, respectivamente.

El mAb de rata conjugado con ficoeritrina (PE) anti-IFN γ murino fue suministrado por Becton Dickinson (clon XMG1.2). Se utilizó en el ensayo de ICS diluido 1/100.

3.1.4. Péptidos.

Los péptidos fueron sintetizados en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (modelo 433A) y purificados. La identidad se confirmó mediante espectrometría de masas en un equipo de MALDI-TOF de Brücker Daltonics (modelo REFLEX) por el Dr. D. López (Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Microbiología, Madrid, España). Se comprobó la homogeneidad de todos los péptidos positivos en ensayos de citotoxicidad mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en un equipo Smart (Amersham Pharmacia Biotech). Los péptidos se nombraron indicando el extremo amino y carboxilo en la secuencia de aa de la proteína F del VRS de la cepa Long. Las secuencias son F31-40: EFYQSTCSAV, F32-40: FYQSTCSAV, F85-93: KYKNAVTEL, F92-106: ELQLLMQSTPAANNR, F249-257: TYMLTNSEL, F249-258: TYMLTNSELL, F365-373: VFCDTMNSL, F467-475: LYVKGEPII. Se emplea el código de una letra para los aa.

3.2. LÍNEAS CELULARES Y SU CULTIVO.

3.2.1. Líneas celulares.

Células P13.1: derivadas de la línea celular P815 (ATCC: TIB64) de mastocitoma de ratón DBA/2 con haplotipo H-2^d, por transfección con el gen lacZ que codifica la proteína β -galactosidasa de *E. coli* (Carbone y Bevan 1990). Fue cedida por el Dr. H.-G. Rammensee (Universidad de Tübingen, Tübingen, Alemania). Se cultivaron en suspensión en IMDM o RPMI 1640.

Células T2/L^d, T2/K^d y T2/K^d/TAP: derivadas de la línea linfoblastoide humana T2 deficiente en TAP y otros genes del MHC como LMP-2 y LMP-7, por transfección con el gen del alelo de MHC de clase I murino L^d (Crumpacker y col. 1992), o K^d (Zhou y col. 1994), y

con los genes de TAP de rata en el caso de la línea T2/K^d/TAP. La línea T2/L^d fue cedida por el Dr. P. Cresswell (Universidad de Yale, New Haven, E.E.U.U.) a través del Dr. M. Groettrup (Hospital Cantonal San Gallen, Suiza). Las líneas T2/K^d y T2/K^d/TAP fueron cedidas por el Dr. G. Hämmerling (Centro Alemán de Investigación del Cáncer, Heidelberg, Alemania). Se cultivaron en suspensión en RPMI 1640.

Células BALB/c y BCH4: los fibroblastos BALB/c y la línea BCH4 de fibroblastos embrionarios persistentemente infectados con el virus de la cepa Long de VRS humano (Ferne y col. 1981) fueron obtenidos por el Dr. B. Ferne (Universidad de Georgetown, Manassas, VA, E.E.U.U.) y cedidos por la Dra. G. Taylor (Instituto para la Salud Animal, Compton, Reino Unido). Son células adherentes y se cultivaron en DMEM.

Células CV1: fibroblastos adherentes de riñón de mono verde africano (ATCC: CCL-70). Se cultivaron en DMEM.

Células L/K^d, L/D^d y L/L^d: derivadas de células L de riñón de ratón C₃H de haplotipo H-2^k por transfección con los genes de los alelos de MHC de clase I K^d, D^d o L^d, respectivamente. La línea L/K^d (Eisenlohr y col. 1992a) fue cedida por el Dr. J. Yewdell (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, E.E.U.U.). La línea L/D^d (Abastado y col. 1987) fue cedida por el Dr. J. P. Abastado (Instituto Pasteur, París, Francia). La línea L/L^d (Del Val y col. 1988) fue cedida por el Dr. U. H. Koszinowski (Universidad de Munich, Munich, Alemania). Son células adherentes y se cultivaron en IMDM.

3.2.2. Cultivo de líneas celulares.

Todas las células se crecieron a 37°C en una atmósfera con 98% de humedad. Las células cultivadas en RPMI 1640 se crecieron en una atmósfera con 5% de CO₂, las células cultivadas en otros medios de cultivo se crecieron en una atmósfera con 9% de CO₂.

Las células adherentes se subcultivaron desprendiéndolas con la solución de tripsina-EDTA tras lavar con PBS.

Para almacenarlas, las células se resuspendieron en SBF con un 10% de dimetilsulfóxido y se congelaron en nitrógeno líquido.

Se realizaron controles regulares de ausencia de micoplasmas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.3. VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL.

El VRS humano (cepa Long) fue cedido por el Dr. J. A. Melero (Centro Nacional de Microbiología, Madrid, España). VRS se produjo en monocapas de células HEp-2 según procedimientos ya descritos (García-Barreno y col. 1988), y se tituló por formación de placas

de lisis en células HEp-2 expresando el título viral en número de unidades formadoras de placa (u.f.p.) por mL. Los lotes de VRS humano (cepa Long) se produjeron en el Centro Nacional de Microbiología (Madrid, España) por la Dra. B. García-Barreno o el Dr. M. A. Rico-Daza.

3.4. VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES.

3.4.1. rVV que expresan formas de la proteína F de VRS Long.

La construcción del recombinante vvF codificando el gen de la proteína F de VRS Long (VRBF) ha sido descrita (Bembridge y col. 1998).

El recombinante vvF- Δ F2 codifica una forma de la proteína F en la que se ha eliminado la subunidad F2 por delección de los aa 34-128 (ambos incluidos), introduciendo además la sustitución E31D como consecuencia de la estrategia de clonación.

El recombinante vvFsig⁻ codifica una forma citosólica de la proteína F en la que se han delecionado los primeros 21 aa correspondientes a la secuencia señal introduciendo un nuevo codón AUG delante de la F22 (Bembridge y col. 1999).

El recombinante vvFtm⁻ codifica una forma secretada de la proteína F en la que se han delecionado los últimos 50 aa correspondientes a la región transmembrana (Bembridge y col. 1999). La construcción de recombinantes que codifican formas de la proteína F secretada en las que se han mutado los sitios de furina ha sido descrita (González-Reyes y col. 2001). El sitio I de furina se ha mutado por sustitución de aa en el virus vvFtm⁻ R108N/R109N (vvFtm⁻ I⁻), y el sitio II de furina se ha delecionado en el virus vvFtm⁻ Δ 131-134 (vvFtm⁻ II⁻). El virus vvFtm⁻ R108N/R109N Δ 131-134 (vvFtm⁻ I⁻ II⁻) codifica por tanto una forma de la proteína F que se secreta como forma F0 no procesada.

Todos estos virus se construyeron siguiendo el método de Blasco y Moss (Blasco y Moss 1995) utilizando la cepa vRB12 derivada de WR. El virus vRB12 es defectivo en formación de placas de lisis ya que carece del gen que codifica la proteína VP37. Los insertos del gen F o derivados fueron subclonados bajo el promotor fuerte de vaccinia sintético temprano/tardío en el plásmido pRB21, que proporciona además una copia completa del gen VP37 permitiendo seleccionar los rVV en base a la formación de placas de lisis.

El virus VAFS2 codifica bajo el promotor temprano-tardío 7.5K una forma de la proteína F con una única sustitución de aa, F237S, que causa la retención de la proteína antes del compartimento intermedio del Golgi (López y col. 1996). El rVV se obtuvo siguiendo el procedimiento de Chakrabarti (1985) (Chakrabarti y col. 1985) a partir del plásmido pSC11,

y es por lo tanto deficiente en la actividad timidín kinasa, lo que conlleva su atenuación *in vivo*.

Todos estos virus fueron cedidos por el Dr. J. A. Melero (Centro Nacional de Microbiología, Madrid, España), y se representan en la **Figura 3**.

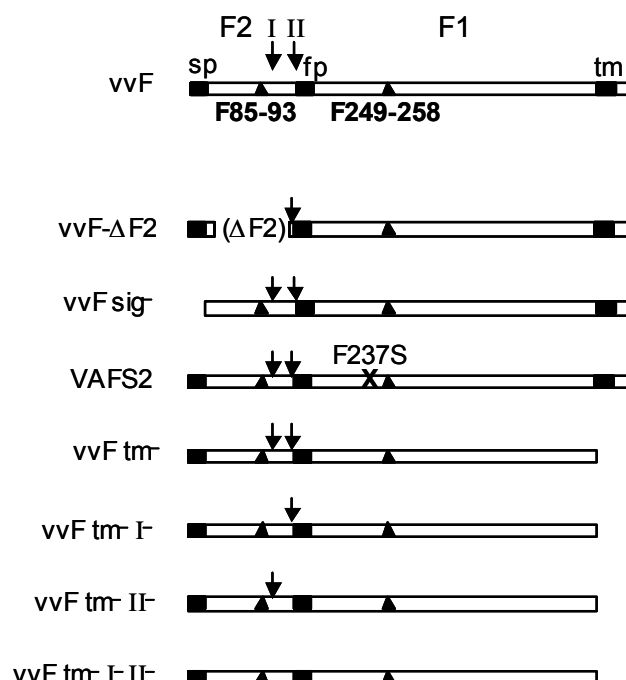


Figura 3. rVV que codifican diferentes formas de la proteína F de VRS Long y han sido utilizados en este trabajo. El virus vvF codifica la forma nativa de la proteína F de VRS Long. Se indican las regiones hidrofóbicas correspondientes al péptido señal (sp), péptido de fusión (fp), y región transmembrana (tm). El procesamiento por proteasas tipo furina en los sitios de corte I y II (flechas) rinde las subunidades F1 y F2 que permanecen unidas entre sí por un puente disulfuro. Los epítipos de CTL (▲) presentados por K^d estudiados son F85-93 (KYKNAVTEL) y F249-258 (TYMLTNSELL). El virus vvF-ΔF2 codifica una proteína F en la que se han delecionado los aa 34-128. El virus vvFsig⁻ codifica una forma citosólica de la proteína F por delección de los aa 1-21 correspondientes a la secuencia señal. El virus VAFS2 codifica una forma de la proteína F que se retiene antes del compartimento intermedio del Golgi debido a la mutación puntual F237S. El virus vvFtm⁻ codifica una forma secretada de la proteína F. Los virus vvFtm⁻ I⁻, vvFtm⁻ II⁻ y vvFtm⁻ I⁻ II⁻ codifican formas secretadas de la proteína F que carecen de uno o ambos sitios de procesamiento. El sitio I de furina está mutado por sustitución de aa en vvFtm⁻ R108N/R109N (vvFtm⁻ I⁻) y el sitio II de furina está mutado por delección en vvFtm⁻ Δ131-134 (vvFtm⁻ II⁻). Así, el virus doblemente mutado vvFtm⁻ R108N/R109N Δ131-134 (vvFtm⁻ II⁻) codifica una proteína F0 secretada. La cepa parental de los virus representados fue WR.

3.4.2. Otros rVV.

Cepa silvestre Western Reserve (WR).

El virus vvbFur que expresa la proteasa furina bovina bajo el promotor temprano-tardío 7.5K de vaccinia en el locus tk fue construido en la cepa WR (Vey y col. 1994) y cedido por el Dr. W. Garten (Universidad de Marburgo, Marburgo, Alemania).

El virus NP_{M147-155} expresa, bajo el promotor 7.5K de vaccinia, el epítipo NP₁₄₇₋₁₅₅ TYQRTRALV precedido de una M iniciadora de la traducción (Bacik y col. 1994).

El virus SNP_{A147-155} expresa, bajo el promotor 7.5K de vaccinia, el epítipo NP₁₄₇₋₁₅₅ TYQRTRALV precedido de una A y de la secuencia señal de adenovirus (Eisenlohr y col. 1992a).

El virus HBe expresa, bajo el promotor 7.5K de vaccinia, la proteína HBe del virus de la hepatitis B.

El virus sC-A9 expresa, bajo el promotor 7.5K de vaccinia, la quimera sC-A9 derivada de HBe por inserción en su extremo carboxilo del epítipo 9pp89 de la proteína pp89 de citomegalovirus murino, y de la secuencia señal de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe en lugar de la secuencia señal natural de la proteína HBe.

3.4.3. Producción, purificación y titulación de rVV.

Los virus rVV se crecieron en monocapas de células CV1 en fase exponencial de crecimiento. La infección se realizó a una multiplicidad de infección (m.o.i.) expresada en u.f.p. por célula de 0,05 y se dejó progresar hasta que el efecto citopático fue generalizado (48-72 h). Las células infectadas se recogieron y sometieron a ruptura por procesos de congelación/descongelación y sonicación. Los extractos celulares sonicados clarificados se purificaron mediante ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 36%, de este modo se minimiza el fondo debido a la existencia de antígeno preprocesado en los inóculos virales.

La titulación de los rVV se realizó por duplicado añadiendo a una monocapa de células CV1 diluciones seriadas en DMEM de las muestras virales. Tras una infección de 24-30 h las células se tiñeron durante 1 min con una solución de cristal violeta 2% (p/v) en metanol al 20% en dH₂O. Las placas de lisis formadas se contaron al microscopio. El título viral expresado en número de u.f.p./mL se calculó a partir del promedio de los valores obtenidos. En general, los rVV se titularon de nuevo antes y después de inmunizar ratones o infectar células diana.

3.5. INFECCIONES VIRALES.

Las diferentes líneas celulares se infectaron con rVV como describieron Yewdell y Bennink (Eisenlohr y col. 1992b) con algunas modificaciones. Las células en suspensión se infectaron a una m.o.i. de 3-10. La adsorción viral se realizó durante 1 h a 37°C en PBS con 0,1% BSA a una concentración de 10⁷ células/mL. El inóculo viral se lavó dos veces con PBS al 2% SBF, y la infección se dejó desarrollar a una concentración de 10⁶ células/mL en medio

de cultivo durante 3 h en el caso de las células P13.1, y de 5 a 6 h en el caso de las células derivadas de la línea T2, a no ser que se indique diferentemente. Las células adherentes L/D^d y L/L^d se infectaron a una m.o.i. de 10 en pocillos con 3×10^5 células en $4,5 \text{ cm}^2$. La adsorción viral se realizó durante 1 h a 37°C con $150 \mu\text{L}$ PBS con 0,1% BSA. El inóculo viral se lavó dos veces con PBS al 2% SBF, y la infección se dejó desarrollar en medio de cultivo durante la noche.

En el caso de VRS las células se infectaron durante 16-40 h a una m.o.i de 0.3-3, tras una adsorción de 90 min seguida de lavados. Se utilizó medio RPMI al 2,5% SBF.

Las infecciones a tiempo 0 h se realizaron tras una adsorción de 1 h a 4°C , lavando el inóculo viral en presencia de BFA para prevenir la posterior presentación antigénica endógena ($5 \mu\text{g/mL}$).

La adsorción en presencia de inhibidores se realizó a una concentración 5 veces superior a la concentración en uso durante el lavado realizado tras la adsorción y la infección. La BFA se utilizó en la infección a $5 \mu\text{g/mL}$. La LC se empleó a $10 \mu\text{M}$. El inhibidor de furina decRVKR-cmk se utilizó a $50 \mu\text{M}$. El inhibidor de aminopeptidasas LeuSH se utilizó a $30 \mu\text{M}$ en medio con β -mercaptoetanol fresco.

3.6. INMUNIZACIÓN DE RATONES.

Para la inducción de CTL policlonales específicos de epítopos de la proteína F de VRS humano, se infectaron intraperitonealmente ratones BALB/c (haplotipo H-2^d) con 10^7 u.f.p. de vvF o vvF- ΔF2 . Entre 3 y 4 semanas tras la infección se administró una dosis de recuerdo idéntica, y a partir de 3 ó 4 semanas más tarde se sacrificaron los ratones para obtener esplenocitos. Las líneas CTL VRS/F85-93, CTL VRS/F249-258 y CTL VRS/M2₈₂₋₉₀ se generaron con esplenocitos obtenidos de ratones infectados por vía intranasal con 10^6 u.f.p. de la cepa Long de VRS humano, y sacrificados meses más tarde.

Con el fin de estudiar *ex vivo* la respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de epítopos de la proteína F se infectaron intraperitonealmente ratones con 10^7 u.f.p. de vvF. La respuesta primaria se estudió en ratones sacrificados entre 7 y 8 días tras la infección. En el caso de la respuesta de memoria, entre 3 y 4 semanas tras la infección se administró una segunda dosis de recuerdo idéntica, y meses más tarde se sacrificaron los ratones para obtener esplenocitos. La respuesta secundaria se estudió en ratones del grupo de memoria que fueron sacrificados 7 días tras la infección con una tercera dosis de recuerdo idéntica. La respuesta primaria *ex vivo* de linfocitos T CD8⁺ específicos de epítopos de la proteína F y del epítipo M2₈₂₋₉₀ se estudió también en ratones infectados por vía intranasal con 10^6 u.f.p. de la cepa Long de VRS 7 días tras la infección.

En todos los casos se utilizaron hembras de ratones BALB/c (haplotipo H-2^d) criadas en la colonia del Centro Nacional de Microbiología (Madrid, España). Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical o en una atmósfera con monóxido de carbono.

3.7. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS DE CTL POLICLONALES ESPECÍFICAS DE LA PROTEÍNA F.

Las líneas de CTL se nombraron indicando el virus utilizado para la inmunización *in vivo* y el agente utilizado para la reestimulación *in vitro* (**Tabla II**), y se obtuvieron siguiendo el procedimiento que se representa esquemáticamente en la **Figura 4**. Así la línea CTL F/VRS se obtuvo de ratones infectados con vvF y fue reestimulada *in vitro* con esplenocitos infectados con VRS, mimetizando un protocolo descrito (Gaddum y col. 1996). Se estimularon esplenocitos de ratones infectados con vvF (10^7 esplenocitos/mL) con esplenocitos de ratones sanos (2×10^6 esplenocitos/mL) infectados durante 90 min con VRS Long a una m.o.i. de 0,4 (relación entre células efectoras y estimuladoras E:S = 5:1). Cinco días después se añadió IL2 a una concentración final de 25 U/mL. Los cultivos estables de larga duración se reestimularon semanalmente con IL2 y esplenocitos infectados con VRS a una relación E:S de 3:1.

Tabla II. Líneas de CTL específicas de proteínas de VRS utilizadas en este trabajo.

Línea de CTL ^a	Inmunización <i>in vivo</i>	Reestimulación <i>in vitro</i>	Epítomos potenciales reconocidos	
			F85-93	F249-258
CTL F/VRS	vvF	VRS	+	+
CTL F/BCH4	vvF	BCH4	+	+
CTL F/F85-93	vvF	F85-93	+	-
CTL ΔF2/BCH4	vvF-ΔF2	BCH4	-	+
CTL F/F249-257	vvF	F249-257	-	+
CTL F/F249-258	vvF	F249-258	-	+
CTL VRS/F85-93	VRS	F85-93	+	-
CTL VRS/F249-258	VRS	F249-258	-	+
CTL VRS/M2 ₈₂₋₉₀	VRS	M2 ₈₂₋₉₀	-	-

^aLas líneas de CTL se nombraron indicando el virus utilizado para la inmunización *in vivo* separado por una barra (/) del agente utilizado para la reestimulación *in vitro*.

Las líneas CTL F/BCH4 y CTL ΔF2/BCH4 se generaron estimulando esplenocitos de ratones infectados con vvF (5×10^6 esplenocitos/mL) con células BCH4 (2×10^5 células/mL) tratadas con 90 μg/mL de mitomicina C. Cinco días después se añadió IL2 (25 U/mL). Los cultivos estables de larga duración se reestimularon semanalmente con IL2, esplenocitos y células BCH4 tratadas con mitomicina C a una relación E:S de 3:1 y 5:1, respectivamente.

Las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-257 se generaron mediante estimulación de esplenocitos de ratones infectados con vvF (10^7 esplenocitos/mL) con una concentración de

10^{-10} M del péptido relevante. De la misma forma se generó la línea CTL F/F249-258 pero la concentración de péptido relevante fue 10^{-9} M. Cinco días después de la selección se añadió IL2 (25 U/mL). Los cultivos estables de larga duración se mantuvieron mediante reestimulación semanal con esplenocitos tratados con mitomicina C, pulsados con una concentración de péptido de 10^{-6} M, y lavados. Se utilizó una relación E:S de 3:1, y se cultivaron en medio con IL2 y péptido a la concentración utilizada durante la selección (10^{-10} M para F85-93 y F249-257 y 10^{-9} M para F249-258).

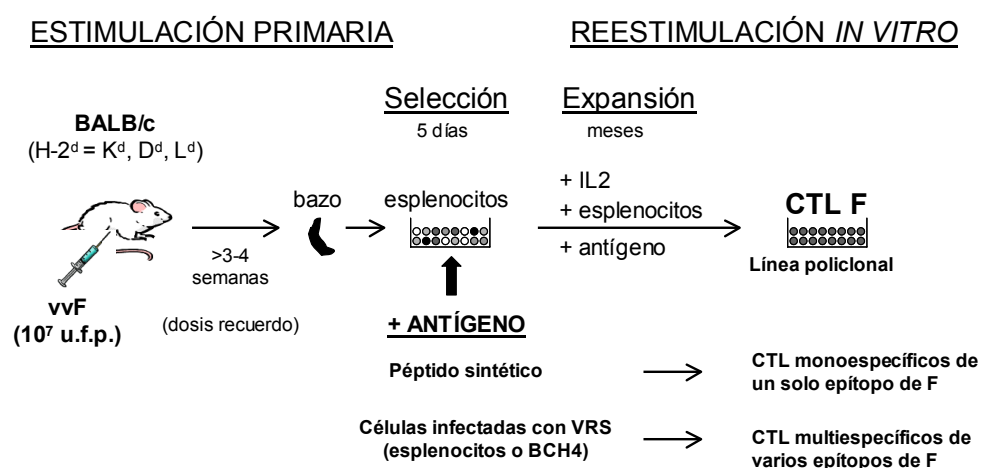


Figura 4. Obtención de líneas de CTL policlonales específicas de la proteína F de VRS.

Las líneas CTL F se generaron *in vitro* a partir de esplenocitos de ratones BALB/c (haplotipo H-2^d) infectados intraperitonealmente con vvF, tras 3-4 semanas se administró una dosis de recuerdo. A partir de 3-4 semanas los ratones se sacrificaron, se extirpó y procesó el bazo para obtener esplenocitos. La selección de CTL específicos de uno o varios epítipos de la proteína F se llevó a cabo durante 5 días en presencia de antígeno. La expansión y mantenimiento de las líneas se realizó mediante reestimulación semanal con IL2, esplenocitos de ratones BALB/c no infectados, y antígeno. Se obtuvieron así líneas policlonales monoespecíficas de un epítipo cuando el antígeno fue un péptido sintético, o multiespecíficas de varios epítipos expresados por células infectadas con VRS utilizadas como fuente de antígeno. Las líneas se mantienen en cultivo durante varios meses.

Las líneas CTL VRS/F85-93, CTL VRS/F249-258 y CTL VRS/M2₈₂₋₉₀ se generaron a partir de esplenocitos de ratones infectados con la cepa Long de VRS siguiendo el método descrito para CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258. En el caso de CTL VRS/M2₈₂₋₉₀ la concentración de péptido M2₈₂₋₉₀ utilizada durante la selección fue de 10^{-9} M.

La línea CTL NP₁₄₇₋₁₅₅ fue generada en nuestro laboratorio por la Dra. M. Oteo y por S. Guil a partir de esplenocitos de ratones BALB/c infectados con un rVV que expresa la nucleoproteína del virus de la gripe. Se utilizó el péptido NP₁₄₇₋₁₅₅ en la reestimulación.

La línea CTL 9pp89 fue generada en nuestro laboratorio por la Dra. Y. Samino a partir de ratones BALB/c infectados con sC-A9 y estimulados con el péptido 9pp89.

Todas las líneas de CTL se cultivaron en medio α MEM.

3.8. ENSAYOS FUNCIONALES DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO A CTL.

La **Figura 5** muestra un esquema de los ensayos funcionales de presentación de antígeno a CTL que se detallan a continuación. En los ensayos de citotoxicidad se detecta el efecto de la presentación de antígeno sobre las células dianas, mientras que en los ensayos de ICS se detecta el efecto sobre los linfocitos T efectores.

3.8.1. Ensayos de citotoxicidad.

Los ensayos de citotoxicidad se basan en realizar una incubación de CTL y células diana con los antígenos de interés, las cuales han sido previamente marcadas con ^{51}Cr , lo cual permite cuantificar la liberación al sobrenadante del cultivo del isótopo al ser lisadas las dianas por los CTL específicos (Brunner y col. 1968). Los ensayos de citotoxicidad estándar (Del Val y col. 1988) se realizaron mediante incubación en placas de 96 pocillos de diluciones seriadas de CTL, y 10^3 células diana por pocillo en medio RPMI 1640 con 5% de SBF inactivado. Las células diana fueron previamente infectadas o no, según se indique, y marcadas durante 60-90 min con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ a 37°C , en presencia o no de péptido 10^{-6} M, y lavadas. Concentraciones de péptido hasta 100 veces inferiores dieron resultados similares. La mezcla de células se incubó a diferentes relaciones de células efectoras y células diana (E:D) durante 3-6 h dependiendo de las células diana (3 h en el caso de las células P13.1, 4 h en el caso de células derivadas de la línea T2, y hasta 6 h en el caso de células adherentes), y se recogió el sobrenadante de cada pocillo para medir su radiactividad en un contador de radiación gamma Packard Cobra II.

El porcentaje de lisis específica de cada muestra se calculó a partir de la media de la lisis espontánea de las células diana en ausencia de CTL (Espontáneas), la media de la lisis de la muestra (Muestra), y la media del valor máximo de radiactividad correspondiente al total de células marcadas (Máximas). Las determinaciones se realizaron por triplicado y se calculó la media. Los valores de liberación espontánea respecto a los de liberación máxima fueron siempre inferiores al 20%.

$$\% \text{ Lisis Específica} = 100 \times [(\text{Muestra} - \text{Espontáneas}) / (\text{Máximas} - \text{Espontáneas})]$$

Las células diana utilizadas en algunos ensayos de citotoxicidad se infectaron previamente con rVV. Cuando la infección se había realizado en presencia de BFA, el marcaje y el lavado de las dianas se hizo en presencia de $5 \mu\text{g/mL}$ BFA, mientras que la incubación con los CTL se hizo en presencia de $1 \mu\text{g/mL}$ BFA.

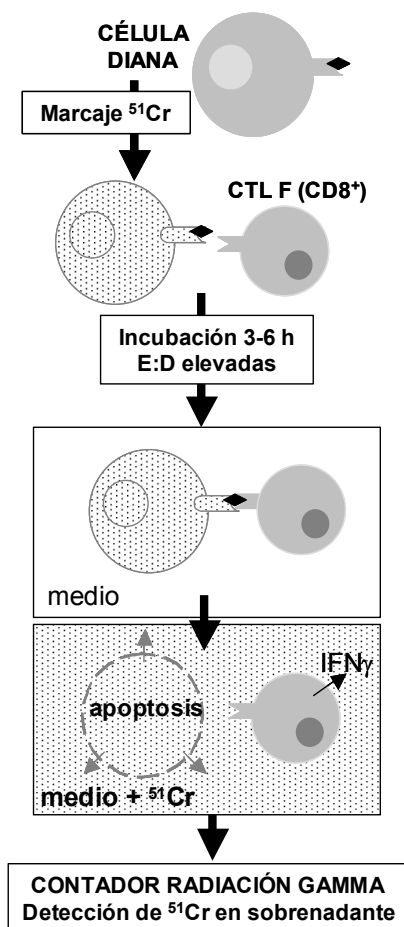
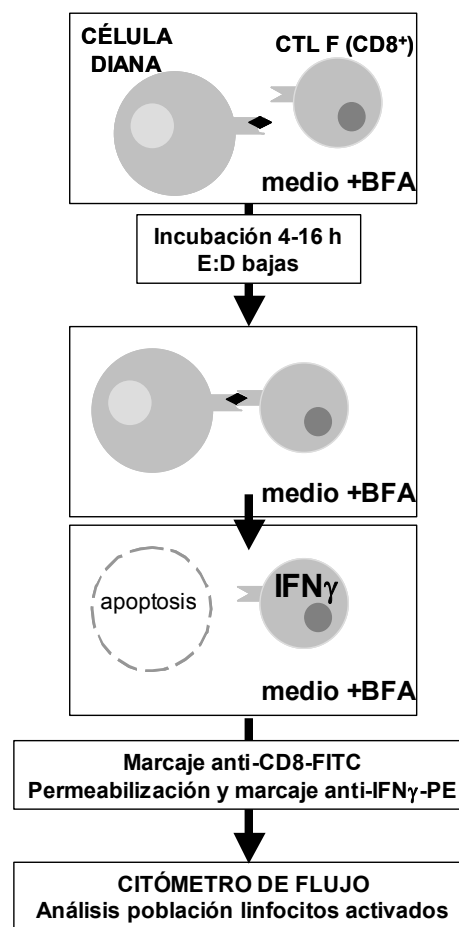
(a) **ENSAYO DE CITOTOXICIDAD**(b) **ENSAYO DE ICS**

Figura 5. Ensayos funcionales de presentación de antígeno a CTL. (a) Los ensayos de citotoxicidad requieren el marcaje previo de las células diana con ^{51}Cr . Las células diana marcadas y células efectoras (CTL) se incubaron durante 3-6 h, dependiendo del tipo de diana utilizada. La relación entre células efectoras y dianas (E:D) fue elevada, con objeto de que los CTL lisaran al mayor porcentaje posible de dianas. Como consecuencia de la lisis de células diana por CTL específicos se libera ^{51}Cr al medio de cultivo, cuya radiactividad se midió utilizando un contador de radiación gamma. (b) En el ensayo de ICS la incubación de las células efectoras y diana se realizó en medio con BFA, un metabolito que inhibe el transporte de salida en la vía secretoria. La incubación de células diana y efectoras se realizó de 4-16 h a relaciones E:D bajas, con objeto de que las dianas activaran al mayor porcentaje posible de CTL específicos. Debido a la presencia de BFA en el medio, los CTL activados acumulan $\text{IFN}\gamma$ intracelularmente. Tras la incubación, las células se tiñeron con mAb marcados con fluorocromos: se tiñeron con un anti-CD8-FITC, se fijaron, y se tiñeron con anti- $\text{IFN}\gamma$ -PE en presencia de permeabilizador. La población de linfocitos CD8^+ de la muestra de células marcadas se analizó utilizando un citómetro de flujo.

3.8.2. Ensayos de tinción intracelular de citoquinas (ICS) con líneas de CTL.

La activación de CTL tras el reconocimiento de antígenos presentados por células diana se estudió mediante ensayos de ICS realizados según métodos ya descritos (Chen y col. 2000). Mediante ICS se cuantifica por citometría el $\text{IFN}\gamma$ sintetizado por linfocitos T CD8^+ activados y acumulado intracelularmente debido a la presencia de BFA en el cultivo. Las células diana y los CTL se incubaron en placas de 96 pocillos a relaciones E:D en torno a

1:5, salvo cuando se indica diferentemente, añadiendo un máximo de 5×10^5 células diana por pocillo. La incubación se realizó en medio RPMI 1640 con 5% de SBF inactivado, y en presencia de $10 \mu\text{g/mL}$ BFA. En general la incubación se realizó durante la noche, salvo cuando las células diana habían sido infectadas ya durante la noche en cuyo caso la incubación fue de 4 h. Los controles positivos de activación se realizaron activando las líneas de CTL con células diana previamente pulsadas durante 30 min con péptido (exceso 10^{-5} M, o una cantidad baja entre 10^{-8} y 10^{-11} M). Tras la activación, las células se incubaron con el mAb conjugado a FITC anti-CD8 α diluido en PBS 2% SBF durante 20 min a 4°C, se fijaron con el reactivo A del kit Intrastain, y se incubaron durante 30 min a 4°C con el mAb conjugado a PE anti-IFN γ diluido en presencia del reactivo B permeabilizador del kit Intrastain. Tras cada paso de marcaje o fijación se realizó un lavado con PBS 2% SBF a 4°C. Las células marcadas se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS 2% SBF, y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón que emite 15 mW a una longitud de onda de 488 nm. Los eventos adquiridos se analizaron utilizando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson). Se adquirió un número de eventos totales que permitiera analizar un mínimo de 4.000 eventos CD8 $^+$ por muestra.

El porcentaje de células activadas se expresó como células IFN γ^+ del total de células CD8 $^+$. Los porcentajes de inhibición específica se calcularon a partir de la fórmula:

$$100 \times \{[(X - CN) - (X_i - CN_i)] / (X - CN)\}$$

en la que X representa el porcentaje de células CD8 $^+$ que fueron positivas para IFN γ en la muestra, y X_i es el valor cuando la infección se realizó en presencia de un inhibidor. Los valores CN y CN_i son los valores equivalentes de los controles negativos en los que la infección se realizó con el rVV parental WR o fue simulada con medio.

3.8.3. Ensayos de ICS con esplenocitos *ex vivo*.

En los ensayos de ICS realizados *ex vivo*, se activaron 4×10^6 esplenocitos por pocillo con un exceso de péptido (10^{-5} a 10^{-7} M) o PBS como control negativo durante hasta 2 h, y se activaron 3 h más en presencia de BFA ($10 \mu\text{g/mL}$). El marcaje con mAb se realizó igual que se ha descrito para las líneas de CTL pero realizando dos lavados tras cada paso de marcaje. La adquisición y análisis de la muestra se realizó tal y como se ha descrito antes, adquiriendo un número de eventos totales que permitiera analizar entre 40.000 y 50.000 eventos CD8 $^+$ por muestra. El porcentaje de esplenocitos activados se expresó como células IFN γ^+ del total de células CD8 $^+$.

4. Resultados

4.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CTL E IDENTIFICACIÓN DE LOS EPÍTOPOS F85-93 Y F249-258 EN LA PROTEÍNA F DE LA CEPA LONG DE VRS.

4.1.1. Confirmación de F85-93 como epítipo conservado mediante el empleo de líneas de CTL generadas *in vitro* específicas de la proteína F.

Con objeto de estudiar en el modelo de ratón la respuesta inmune específica de la proteína F de VRS mediada por linfocitos T CD8⁺, se generaron *in vitro* líneas policlonales de CTL específicas de la proteína F a partir de esplenocitos obtenidos de ratones BALB/c infectados con vvF, un rVV que codifica la secuencia completa de la proteína F de la cepa Long de VRS. Inicialmente, las líneas de CTL policlonales se generaron mediante procedimientos que las mantenían multiespecíficas, es decir, capaces de reconocer el mayor número posible de epítopos de la proteína F. Así la línea CTL F/VRS se generó mediante reestimulación *in vitro* con esplenocitos infectados con VRS Long por procedimientos descritos (Gaddum y col. 1996). Utilizando una nueva aproximación no descrita en la literatura, la línea CTL F/BCH4 se generó mediante reestimulación con células BCH4 (**Tabla III**). Las células BCH4 persistentemente infectadas con VRS Long (Fernie y col. 1981) se han utilizado ampliamente como dianas de CTL específicos de F a pesar de sus niveles reducidos de síntesis de las glicoproteínas virales F y G (Martínez y col. 2001). Sin embargo, no se habían utilizado anteriormente como estimuladoras en la obtención de CTL específicos de F.

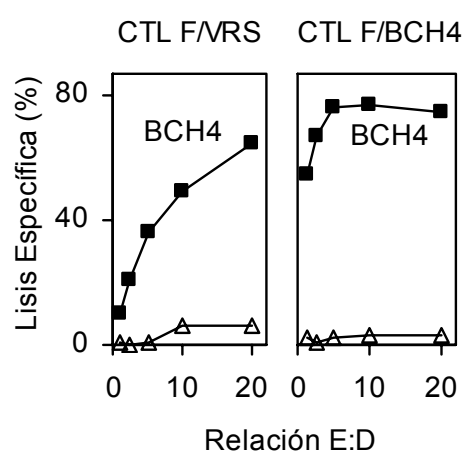
Tabla III. Optimización de condiciones de reestimulación de las líneas de CTL generadas para la realización de este trabajo.

Línea de CTL ^a	Inmunización <i>in vivo</i>	Condiciones de reestimulación <i>in vitro</i>		
		Fuente de antígeno	Condiciones de reestimulación ensayadas	Condición óptima de reestimulación
CTL F/VRS	vvF	VRS	m.o.i. esplenocitos 4 y 0,4.	m.o.i. 0,4
CTL F/BCH4	vvF	BCH4	E:S 5:1, 15:1, 50:1 y 150:1.	E:S 5:1
CTL F/F85-93	vvF	F85-93	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ , 4,5 x 10 ⁻⁸ , 1,5 x 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁸ , 5 x 10 ⁻⁹ , 10 ⁻⁹ y 10 ⁻¹⁰ M.	10 ⁻¹⁰ M
CTL F/F249-257	vvF	F249-257	10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁹ y 10 ⁻¹⁰ M.	10 ⁻¹⁰ M
CTL F/F249-258	vvF	F249-258	10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁹ y 10 ⁻¹⁰ M.	10 ⁻⁹ M

^aLas líneas de CTL se nombraron indicando el virus utilizado para la inmunización *in vivo* separado por una barra (/) del agente utilizado para la reestimulación *in vitro*. En el apartado de Materiales y Métodos se describen procedimientos adicionales. Las condiciones óptimas de reestimulación semanal permitieron mantener estas líneas de CTL en cultivo durante varios meses.

La caracterización funcional de las líneas de CTL se llevó a cabo mediante ensayos de citotoxicidad realizados con células BCH4 marcadas con ^{51}Cr como dianas infectadas con VRS (**Fig. 6**). Ambas líneas, CTL F/VRS y CTL F/BCH4, fueron capaces de reconocer las dianas BCH4 persistentemente infectadas con VRS, mientras que no se observó una lisis significativa con las dianas P13.1 no infectadas. No se utilizaron como dianas negativas los fibroblastos BALB/c (Fernie y col. 1981), supuestas células parentales de las BCH4, ya que, inesperadamente, no se observó presentación de ningún péptido sintético representando epítomos conocidos a CTL específicos y demostradamente activos, es decir, capaces de reconocer los mismos péptidos presentados por otras células diana.

Figura 6. Caracterización funcional de líneas de CTL generadas *in vitro* y multiespecíficas de la proteína F de VRS Long. Se generaron cultivos estables de larga duración de CTL multiespecíficos a partir de ratones BALB/c infectados con un rVV codificando la proteína F de VRS Long (vvF). Los esplenocitos obtenidos de ratones infectados con vvF fueron estimulados con esplenocitos infectados con VRS (CTL F/VRS) o células BCH4 persistentemente infectadas con VRS (CTL F/BCH4). Se utilizaron las líneas CTL F/VRS y CTL F/BCH4 como células efectoras en ensayos de citotoxicidad, y como dianas, células persistentemente infectadas con VRS BCH4 (■) o células no infectadas P13.1 (△). A cada relación E:D se representa la lisis específica calculada a partir de la liberación de ^{51}Cr .



Para el establecimiento de las líneas multiespecíficas CTL F/VRS y CTL F/BCH4 se ensayaron varias condiciones de reestimulación (ver **Tabla III**). En el caso de CTL F/VRS los esplenocitos para la reestimulación *in vitro* se infectaron con VRS a dos m.o.i. diferentes (4 y 0,4), y no se observaron diferencias importantes entre las líneas generadas en la actividad citotóxica frente a células BCH4 (datos no mostrados). Se estableció como condición óptima para la reestimulación *in vitro* de CTL F/VRS la infección de los esplenocitos con la menor cantidad de virus (**Tabla III**). En el caso del establecimiento de líneas CTL F/BCH4 se generaron CTL con diferentes cantidades de células estimuladoras BCH4. Se emplearon 3×10^5 , 10^5 , 3×10^4 y 10^4 BCH4 por pocillo con $7,5 \times 10^6$ esplenocitos de ratones infectados con vvF en la primera estimulación, manteniendo en posteriores reestimulaciones una relación efector:estimulador E:S de 5:1, 15:1, 50:1 y 150:1, respectivamente. Inicialmente, se evaluó la actividad citotóxica de las líneas CTL F/BCH4 generadas frente a dianas BCH4 marcadas con ^{51}Cr (**Fig. 7**). El ensayo de citotoxicidad se realizó en condiciones limitantes de tiempo de incubación por lo que se observaron valores bajos de lisis específica. La cantidad de células estimuladoras utilizada en la generación de CTL F/BCH4 no parece ser crítica, ya que no se observaron grandes diferencias entre las relaciones E:S utilizadas, si bien en sucesivas

reestimulaciones las líneas generadas con menor cantidad de células estimuladoras perdieron actividad citotóxica (datos no mostrados). De esta forma establecimos como condición óptima para la reestimulación *in vitro* de CTL F/BCH4 la mayor cantidad de células estimuladoras y menor relación E:S (**Tabla III**).

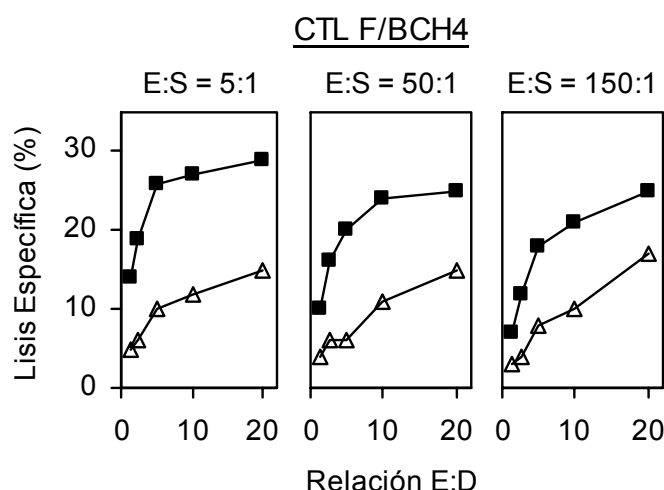


Figura 7. Condiciones de estimulación de la línea CTL F/BCH4. Las líneas CTL F/BCH4 se obtuvieron estimulando esplenocitos de ratones infectados con vvF con células BCH4 persistentemente infectadas con VRS. Se emplearon cantidades diferentes de células estimuladoras (se indica la relación E:S utilizada en las reestimulaciones). No se representa la línea CTL F/BCH4 generada reestimulando con E:S 15:1 porque en este ensayo fue inespecífica. Se realizaron ensayos de citotoxicidad con células BCH4 (■) o células no infectadas P13.1 (△) como dianas.

Al comparar la citotoxicidad de las líneas CTL F/VRS y CTL F/BCH4 (**Fig. 6**) se observó una mejor actividad citotóxica de la línea CTL F/BCH4, por lo que la mayor parte de los ensayos realizados con líneas de CTL multispecíficas de epítomos de la proteína F se llevaron a cabo con la línea CTL F/BCH4, que además requiere un método de reestimulación menos complicado que CTL F/VRS. La línea CTL F/BCH4, aparte de reconocer células infectadas con VRS, fue capaz de detectar eficientemente la presentación de epítomos de la proteína F en células infectadas con vvF (**Fig. 8**). Además, al no observar reconocimiento de células infectadas con el virus vaccinia silvestre WR, se confirmó la ausencia de CTL específicos de vaccinia en CTL F/BCH4, tal y como se esperaba.

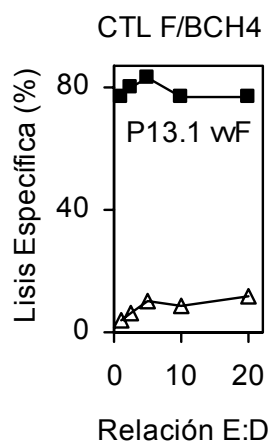


Figura 8. Los CTL F/BCH4 reconocen dianas infectadas con vvF. Ensayo de citotoxicidad realizado con CTL F/BCH4 como células efectoras, y células P13.1 infectadas con vvF (■) o su virus parental WR (△) como dianas.

En ratones BALB/c (haplotipo H-2^d) que expresan K^d, D^d y L^d, los epítomos de la proteína F de la cepa A2 de VRS son presentados únicamente por la molécula de MHC de clase I K^d (Chang y col. 2001). Para verificar si esto también es así en el caso de los epítomos de la proteína F de VRS de la cepa Long, se realizaron ensayos de citotoxicidad con CTL F/BCH4 y dianas transfectadas por separado con cada molécula de MHC de clase I e infectadas con vvF. Se observó presentación eficiente a CTL activos en las células transfectadas con K^d pero no con L^d o D^d (**Fig. 9**). En cada caso se comprobó que las células diana presentaban eficientemente otros péptidos sintéticos a otros CTL activos. Por lo tanto, igual que con VRS A2, en el haplotipo H-2^d los epítomos de CTL de la proteína F de la cepa Long de VRS son presentados únicamente por K^d.

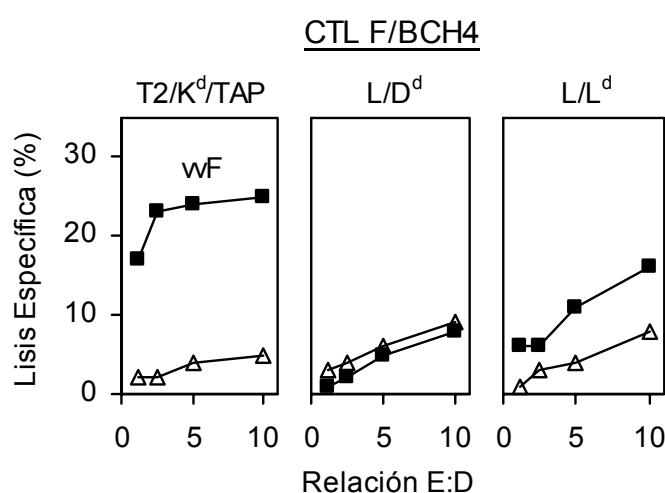


Figura 9. En el haplotipo H-2^d los epítomos de CTL de la proteína F de la cepa Long de VRS son presentados únicamente por K^d. Ensayos de citotoxicidad realizados con CTL F/BCH4 como células efectoras, y células diana transfectadas por separado con las moléculas de MHC de clase I murinas K^d, D^d o L^d, e infectadas durante la noche con vvF (■) o su virus parental WR (△). La ventana de lisis residual con células L/L^d no se observó en otro experimento.

Para identificar epítomos presentados por K^d a las líneas multispecíficas CTL F/VRS y CTL F/BCH4, inicialmente estudiamos si los dos epítomos descritos en la cepa A2 eran reconocidos en ensayos de citotoxicidad. Los péptidos F85-93 y F92-106 correspondientes a estos epítomos en la cepa Long fueron sintetizados y utilizados para sensibilizar células. Encontramos que el péptido F92-106 no fue reconocido por ninguna de las líneas de CTL (**Fig. 10a**). Además se intentó generar una línea CTL F/F92-106 estimulando esplenocitos de ratones infectados con vvF con diferentes concentraciones de péptido F92-106. En ensayos de citotoxicidad no se observó lisis específica significativa de células preincubadas con un exceso de péptido sintético F92-106 (**Fig. 10b**). Por lo tanto en la cepa Long de VRS no tenemos ninguna evidencia de la presencia del epítomo F92-106.

Por otra parte, ambas líneas multispecíficas CTL F/VRS y CTL F/BCH4 fueron capaces de reconocer células sensibilizadas con F85-93 (**Fig. 10a**). Además, se generó una línea estable policlonal monoespecífica de larga duración, CTL F/F85-93, estimulando con el péptido F85-93 esplenocitos de ratones infectados con vvF. Para el establecimiento de la línea CTL F/F85-93 se probaron diferentes concentraciones de péptido F85-93, desde 10⁻⁶ M a 10⁻¹⁰ M (**Tabla III**). Las concentraciones menores de F85-93 permitieron rescatar mejores

CTL, tal y como se aprecia en ensayos de citotoxicidad en los que se utilizaron células sensibilizadas con un exceso de péptido F85-93 (**Fig. 10c**), y en ensayos de titulación en los que se pulsaron dianas con cantidades crecientes de péptido F85-93 (**Fig. 10d**). Establecimos por tanto como condición óptima para la generación de CTL F/F85-93 la estimulación con 10^{-10} M F85-93.

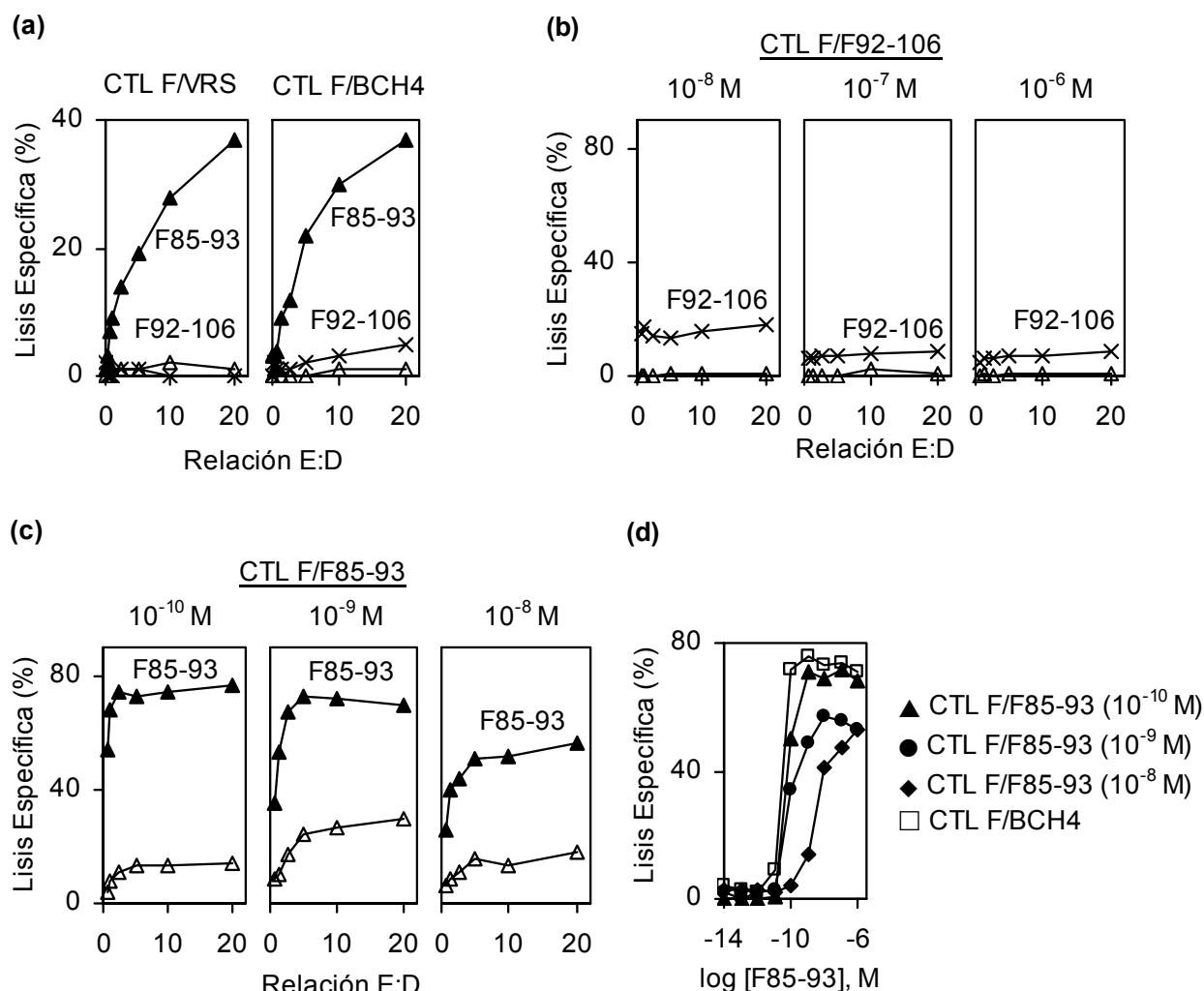


Figura 10. Confirmación de F85-93 como epítipo conservado mediante el empleo de líneas de CTL generadas *in vitro* específicas de la proteína F de la cepa Long de VRS. (a) Ensayos de citotoxicidad realizados con CTL F/VRS y CTL F/BCH4 como células efectoras y dianas P13.1 pulsadas con péptido F85-93 (▲), péptido F92-106 (×) o sin péptido (Δ). (b) Se estimularon esplenocitos de ratones infectados con vvF con las concentraciones indicadas de péptido F92-106 para intentar generar CTL F/F92-106. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con dianas P13.1 pulsadas con péptido F92-106 (×) o sin péptido (Δ). (c) Generación de líneas CTL F/F85-93 mono específicas del epítipo F85-93 estimulando esplenocitos de ratones infectados con vvF con las concentraciones indicadas de péptido F85-93. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con dianas P13.1 pulsadas con péptido F85-93 (▲) o sin péptido (Δ). (d) Ensayos de titulación mediante citotoxicidad realizados con dianas P13.1 pulsadas con concentraciones crecientes de péptido sintético F85-93 a una relación E:D 5:1 con CTL F/BCH4 o las diferentes líneas generadas de CTL F/F85-93 como células efectoras. Se representa el porcentaje de lisis específica calculado a partir de la liberación de ^{51}Cr a las diferentes concentraciones de F85-93 utilizadas para pulsar las dianas.

En los ensayos de titulación del péptido F85-93 también se incluyó la línea multiespecífica CTL F/BCH4, y al igual que la línea óptima de CTL F/F85-93, fue capaz de reconocer concentraciones de F85-93 de hasta 10^{-10} M (**Fig. 10d**). Así mismo la línea CTL F/F85-93 fue capaz de detectar el epítipo en células infectadas con vvF, ya que éstas fueron eficientemente lisadas (**Fig. 11**). En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que tal y como se esperaba por la secuencia conservada en el epítipo y sus regiones flanqueantes, F85-93 también es un epítipo reconocido por CTL en la cepa Long.

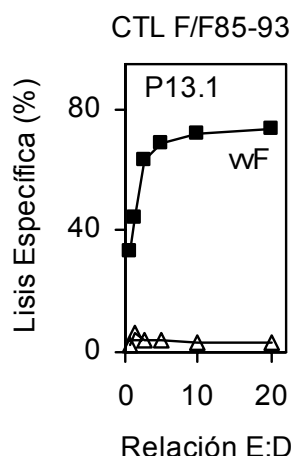


Figura 11. Los CTL F/F85-93 reconocen dianas infectadas con vvF. Ensayo de citotoxicidad realizado con CTL F/F85-93 como células efectoras y células P13.1 infectadas con vvF (■) o su virus parental WR (△) como dianas.

4.1.2. Identificación del epítipo de CTL F249-258 en la proteína F.

Para identificar otros epítipos de CTL potenciales en la proteína F de la cepa Long se utilizó un rVV, vvF-ΔF2, que codifica una proteína F mutante en la que los aa 34-128 se han deletado, y que por tanto no contiene la mayor parte de la subunidad F2 ni el epítipo F85-93 (**Fig. 12a**). Aunque el mutante se construyó de tal forma que permitiera la maduración de la subunidad F1 completa, se detectaron sólo niveles de expresión reducidos en comparación con la proteína nativa (Dr. J. A. Melero, comunicación personal). A pesar de la menor expresión de la proteína mutante, células infectadas con vvF-ΔF2 fueron eficientemente lisadas por la línea multiespecífica CTL F/BCH4, demostrando por lo tanto la presentación a CTL en las células infectadas con vvF-ΔF2 de uno o más epítipos no descritos (**Fig. 12b**). Se puede argumentar que un mimotopo de F85-93 podría estar siendo reconocido por los clones de CTL específicos de F85-93 presentes en la línea multiespecífica. Para estudiar esta cuestión las mismas dianas se enfrentaron a la línea monoespecífica CTL F/F85-93 y no se observó lisis (**Fig. 12b**), descartándose este argumento.

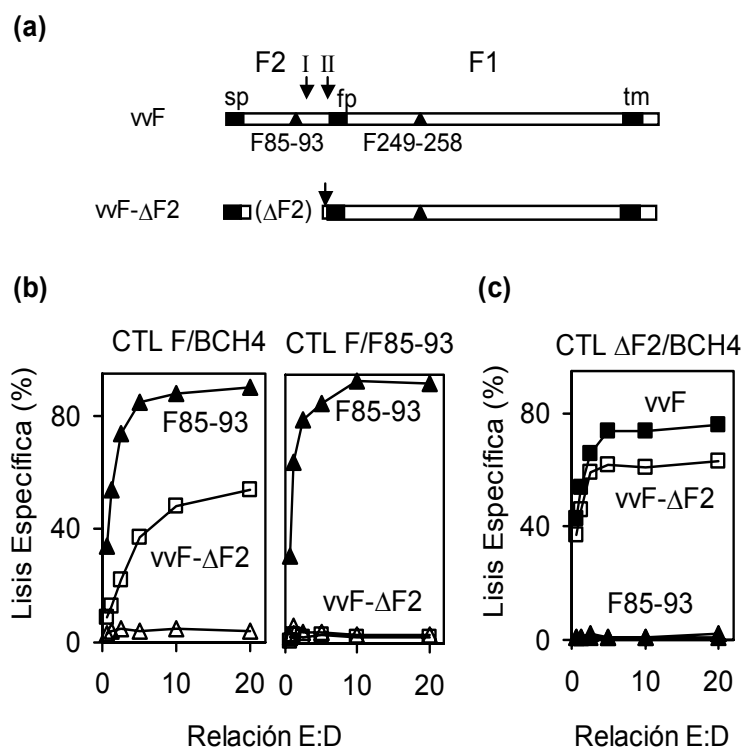


Figura 12. Evidencia de la presentación a CTL específicos de F de uno o más epítomos nuevos no descritos. (a) El virus vvF codifica la forma nativa de la proteína F de VRS Long. El virus vvF-ΔF2 codifica una proteína F mutante en la que se han deletado los aa 34-128. (b) Se infectaron células P13.1 con vvF-ΔF2 (□), y se utilizaron como dianas en un ensayo de citotoxicidad realizado con CTL F/BCH4 y CTL F/F85-93 como células efectoras. Como control positivo y negativo se utilizaron, respectivamente, células P13.1 infectadas con WR en presencia (▲) o no (△) del péptido F85-93. (c) Ensayo de citotoxicidad realizado con CTL ΔF2/BCH4 como efectoras. El cultivo de larga duración CTL ΔF2/BCH4 se obtuvo de ratones infectados con vvF-ΔF2 mediante estimulación con células BCH4 persistentemente infectadas con VRS. Se utilizaron las dianas P13.1 infectadas con vvF (■) o vvF-ΔF2 (□), o infectadas con WR en presencia (▲) o no (△) de péptido F85-93.

Además, se generó una línea multispecífica CTL ΔF2/BCH4 a partir de ratones infectados con el virus vvF-ΔF2. Así la línea CTL ΔF2/BCH4 necesariamente carece de clones de CTL específicos de F85-93 ya que no se han inducido durante la inmunización de los ratones (ver **Tabla II** en Materiales y Métodos, página 30). Se realizaron ensayos de citotoxicidad y tal y como se esperaba la línea CTL ΔF2/BCH4 fue incapaz de lisar dianas cargadas exógenamente con F85-93, aunque sin embargo sí fue capaz de reconocer dianas infectadas con vvF o con vvF-ΔF2 (**Fig. 12c**). Por lo tanto demostramos la existencia de uno o más epítomos nuevos no caracterizados de la proteína F de VRS Long localizados en la subunidad F1 o en los primeros 33 aa de la proteína.

Con objeto de identificar el o los epítomos nuevos, la secuencia de la proteína F de VRS Long se sometió a programas de predicción de epítomos de MHC de clase I que

emplean algoritmos optimizados basados en los motivos consenso de unión a MHC (**Tabla IV**). Estos algoritmos no predicen epítomos no canónicos. Los programas usados fueron BIMAS (Parker y col. 1994) y SYFPEITHI (Ramensee y col. 1999).

Tabla IV. Predicción de posibles epítomos de 9 y 10 aa de longitud presentables por K^d a partir de las secuencias de la proteína F de VRS de las cepas Long y A2. Se emplearon dos programas de predicción de ligandos de MHC de clase I: BIMAS y SYFPEITHI; y el programa NetChop 2.0 que predice extremos carboxilo probables en ligandos de MHC de clase I. Para cada programa de predicción se indica en negrita la máxima puntuación asignada a un péptido. El análisis de epítomos virales presentados por K^d ya descritos permitió establecer un umbral interno para la selección de péptidos a sintetizar (puntuación BIMAS ≥ 200 ; puntuación SYFPEITHI ≥ 20). Las celdas grises indican los péptidos que fueron sintetizados y utilizados en ensayos de citotoxicidad.

NONÁMEROS presentables por K^d predichos en la proteína F de VRS Long y A2

Posición ^a	Péptido ^a	BIMAS ^b		SYFPEITHI		NetChop 2.0	Observaciones ^d
		Puntuación	Orden ^c	Puntuación	Orden ^c		
249	TYMLTNSEL	4800	1°-2°	24	2°-3°	0.978	decámero confirmado
467	LYVKGEPII	4800	1°-2°	22	5°	0.950	
85	KYKNAVTEL	3456	3°	30		1	confirmado
504	AFIRKSDEL	1920	4°	-	-	0.336	decámero
365	VFCDTMNSL	1382	5°	20	7°-11°	0.953	
222	EFQQKNNRL	960	6°	18	16°-20°	0.724	decámero
32	FYQSTCSAV	720	7°-8°	24	2°-3°	0.639	decámero
341 ^e	WYCDNAGSV	720	7°-8°	23	4°	0.999	
136	RFLGFLGV	400	9°	19	12°-15°	0.187	en sitio furina
487	EFDASISQV	288	10°	18	16°-20°	0.788	
52	WYTSVITIE	240	11°	19	12°-15°	0.008	decámero (no en vvF-ΔF2)
191	KVLDLKNYI	199	13°	20	7°-11°	0.808	

DECÁMEROS presentables por K^d predichos en la proteína F de VRS Long y A2

Posición ^a	Péptido ^a	BIMAS ^b		SYFPEITHI		NetChop 2.0	Observaciones ^d
		Puntuación	Orden ^c	Puntuación	Orden ^c		
197	NYIDKQLLPI	4800	1°-2°	21	3°-4°	0.070	
249	TYMLTNSELL	4800	1°-2°	24	1°	0.995	nonámero confirmado
52	WYTSVITIEL	2880	3°	21	3°-4°	0.987	nonámero (no en vvF-ΔF2)
504	AFIRKSDELL	2304	4°	19	6°-8°	0.174	nonámero
139	GFLGVGSAI	1920	5°	20	5°	0.279	cerca sitio furina
222	EFQQKNNRLL	960	6°-8°	19	6°-8°	0.468	nonámero
386	IFNPKYDCKI	960	6°-8°	17	10°-12°	0.917	
19	TFCFASSQNI	960	6°-8°	19	6°-8°	0.027	
548	LYCKARSTPV	600	9°	22	2°	0.975	en región tm y cola citosólica
31	EFYQSTCSAV	240	10°	-	-	0.639	nonámero

^aSe indica la secuencia del péptido y la posición del extremo amino terminal en la proteína F.

^bLa puntuación en BIMAS corresponde a una estimación del tiempo medio de disociación (min) de complejos K^d que contienen el péptido.

^cEn cada programa se ordenaron los primeros 20 péptidos predichos como posibles epítomos presentados por K^d.

^dSe indica si un péptido se predice como posible epítomo de 9 y también de 10 aa, y localizaciones de interés en la secuencia de la proteína F nativa. Se indican los epítomos confirmados que han sido publicados por otros (F85-93, Chang y col. 2001) o como resultado de este trabajo (F249-258, ver Anexo).

^eEste péptido no se ha utilizado en ensayos de citotoxicidad debido a problemas en su síntesis.

Los epítomos putativos presentados por K^d predichos con una alta puntuación por ambos programas fueron cribados con el algoritmo NetChop 2.0, que predice extremos carboxilo probables en ligandos de MHC de clase I (Keşmir y col. 2002), y se sintetizaron los péptidos correspondientes a diversos epítomos predichos. En determinados casos, se sintetizaron variantes en longitud de la misma región que dieron puntuaciones similares. Establecimos nuestro umbral interno de puntuación en cada programa de predicción analizando epítomos virales presentados por K^d ya descritos.

La presentación de péptidos a la línea CTL F/BCH4 se estudió en ensayos de citotoxicidad realizados con dianas T2/ K^d pulsadas con péptido. La **Figura 13** muestra que las dianas pulsadas con los péptidos F249-257 y F249-258 fueron lisadas eficientemente por CTL, al igual que las dianas pulsadas con el péptido F85-93. De nuevo, para controlar que los péptidos F249-257/8 no estaban siendo reconocidos de forma cruzada por clones de CTL específicos de F85-93, las mismas dianas se enfrentaron a CTL F/F85-93, que sólo fueron capaces de reconocer el péptido F85-93 (**Fig. 13**, segundo panel). Además, para controlar la posibilidad de una unión no específica a otras moléculas presentadoras humanas expresadas por las células T2, se realizó un ensayo con CTL F/BCH4 y dianas T2/ L^d pulsadas con péptido, y no se observó lisis específica (**Fig. 13**, tercer panel). Estos resultados indican que los péptidos F249-257 y F249-258 son presentados por K^d a clones de CTL específicos.

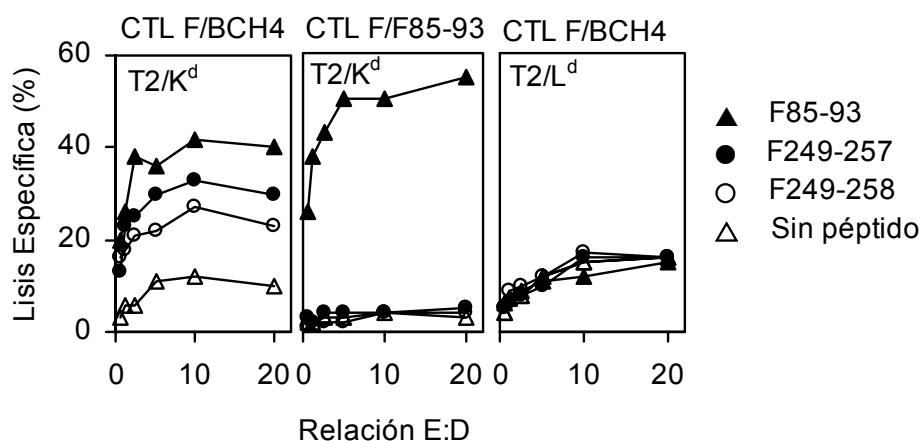
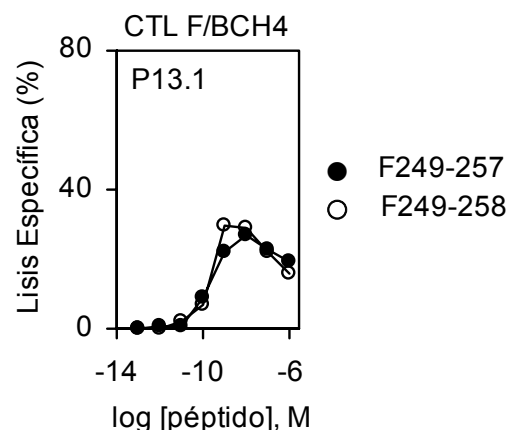


Figura 13. Reconocimiento por CTL específicos de F de los péptidos sintéticos F249-257 y F249-258 predichos como epítomos presentados por K^d . Se pulsaron células T2 humanas transfectadas con las moléculas de MHC de clase I K^d o L^d , con los péptidos F85-93 (▲), F249-257 (●) o F249-258 (○); o sin péptido (△). Estas células se utilizaron como dianas en un ensayo de citotoxicidad con CTL F/BCH4 y CTL F/F85-93 como efectoras.

Se realizaron ensayos de titulación para estudiar si concentraciones más bajas de péptido también eran reconocidas, ya que las dianas fueron pulsadas con altas concentraciones de péptido (10^{-6} M). La **Figura 14** muestra que hubo lisis eficiente de dianas pulsadas con concentraciones de péptido de hasta 10^{-9} M, y que el nonámero y el decámero

fueron igualmente reconocidos por CTL F/BCH4. La reducción en la lisis que se observa a altas concentraciones de péptido puede deberse a lisis recíproca entre CTL. En conjunto, estos resultados demuestran que concentraciones estándar de los péptidos F249-257 y F249-258 pueden activar específicamente a CTL específicos de la proteína F de VRS Long.

Figura 14. Concentraciones estándar de los péptidos sintéticos F249-257 y F249-258 predichos como epítomos presentados por K^d son reconocidas por CTL F/BCH4. Ensayo de titulación mediante citotoxicidad realizado a la relación E:D 5:1 con CTL F/BCH4 como efectoras, y células P13.1 pulsadas con concentraciones crecientes de péptido sintético F249-257 (●) o F249-258 (○) como dianas.



Además, se generaron las líneas policlonales monoespecíficas CTL F/F249-257 y CTL F/F249-258 a partir de ratones infectados con vvF estimulando los esplenocitos con péptido sintético F249-257 o F249-258, respectivamente. Para el establecimiento de las líneas se analizaron diferentes concentraciones de péptido en la reestimulación (**Tabla III**). Los ensayos de citotoxicidad realizados con células sensibilizadas con un exceso de péptido F249-257 (**Fig. 15a**), y los ensayos de titulación realizados pulsando dianas con cantidades crecientes del mismo péptido (**Fig. 15b**), permitieron concluir que la concentración óptima para la generación de CTL F/F249-257 fue 10^{-10} M, exactamente la misma concentración que habíamos encontrado óptima previamente para la línea CTL F/F85-93 (ver **Tabla III** y **Fig. 10**). En el caso de la línea CTL F/F249-258 en la que la estimulación se llevó a cabo con el decámero, la concentración óptima para la generación de la línea fue 10^{-9} M (**Fig. 15c y 15d**). Las concentraciones ensayadas para el establecimiento de las líneas CTL F/F249-257 y CTL F/F249-258 se resumen en la **Tabla III**, así como la concentración óptima para la generación de líneas estables de larga duración. Se realizaron también ensayos de citotoxicidad con dianas infectadas utilizando como células efectoras CTL específicos del nonámero. En la **Figura 16** se observa que la línea CTL F/F249-257 fue capaz de lisar tanto dianas infectadas con vvF como con vvF- Δ F2. Por lo tanto, el conjunto de estos resultados nos permite concluir que hemos identificado en la proteína F de VRS un nuevo epítomo de CTL que es presentado por K^d como un nonámero (F249-257: TYMLTNSEL) o un decámero (F249-258: TYMLTNSELL).

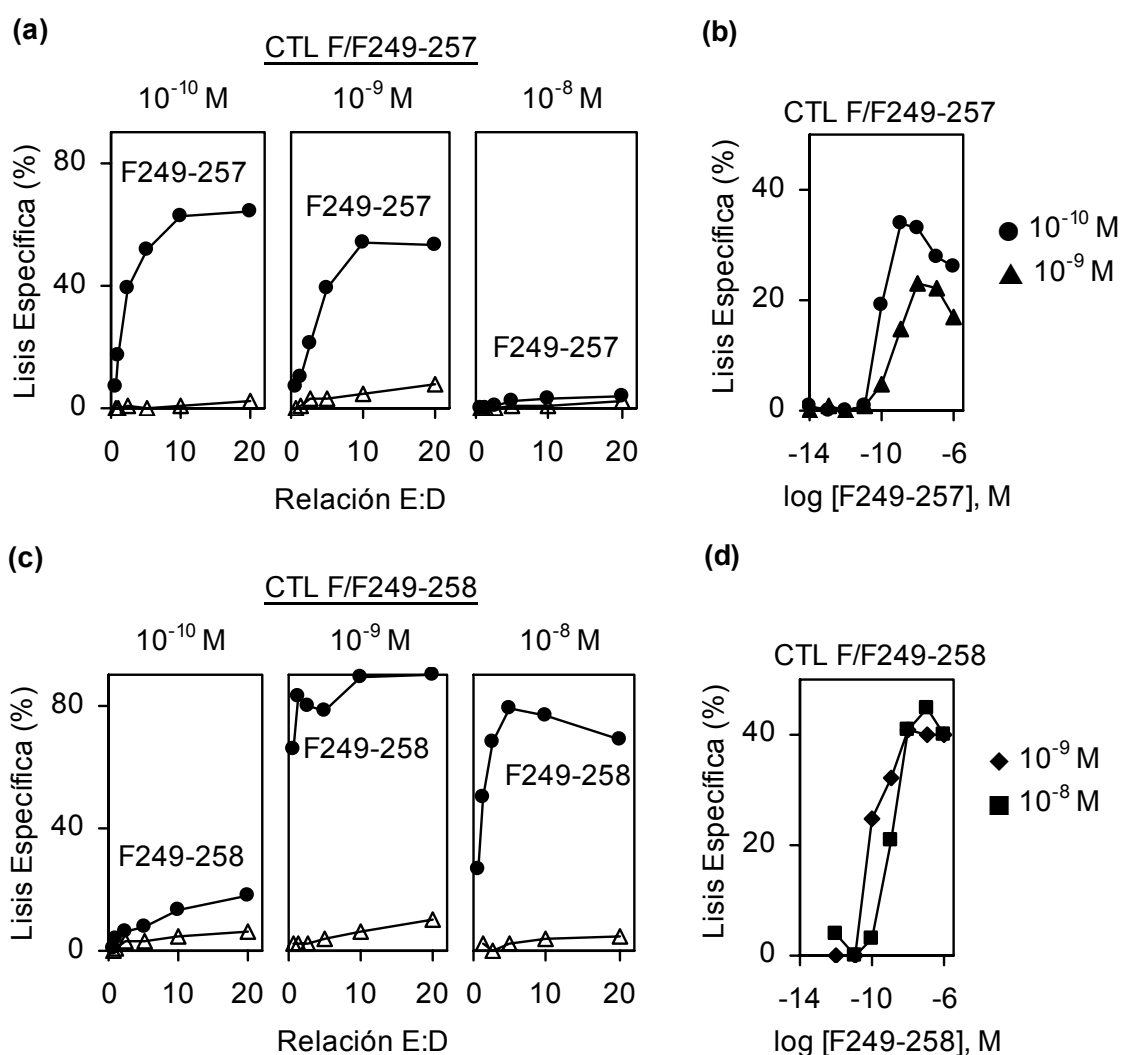


Figura 15. Generación *in vitro* de líneas CTL F/F249-257 y CTL F/F249-258 mono-específicas. (a) Se estimularon esplenocitos de ratones infectados con vvF con las concentraciones indicadas de péptido F249-257 para generar líneas CTL F/F249-257, que se utilizaron como efectoras en ensayos de citotoxicidad realizados con dianas P13.1 pulsadas con péptido F249-257 (●) o sin péptido (△). (b) Ensayos de titulación mediante citotoxicidad realizados a una relación E:D 5:1 con dianas P13.1 pulsadas con concentraciones crecientes de péptido sintético F249-257, y las líneas CTL F/F249-257 como células efectoras. (c) Se estimularon esplenocitos de ratones infectados con vvF con las concentraciones indicadas de péptido F249-258 para generar líneas CTL F/F249-258, que se utilizaron como efectoras en ensayos de citotoxicidad realizados con dianas P13.1 pulsadas con péptido F249-258 (●) o sin péptido (△). (d) Ensayos de titulación mediante citotoxicidad realizados a una relación E:D 5:1 con dianas P13.1 pulsadas con concentraciones crecientes de péptido sintético F249-258, y las líneas CTL F/F249-258 como células efectoras.

Se controló que las líneas de CTL específicas de epítomos de la proteína F no se pudieron generar por activación primaria *in vitro* (ver apartado 4.1.3., **Fig. 19c**). Igualmente no se pudieron seleccionar de forma natural las líneas de CTL al dejar sin estimular los esplenocitos de ratones infectados con vvF (datos no mostrados).

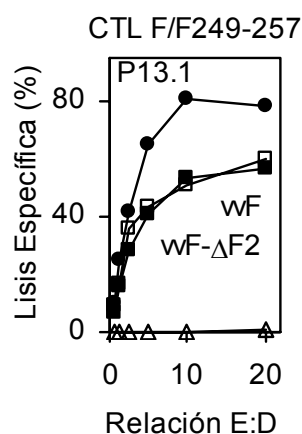


Figura 16. La línea de CTL específica de F249-257 reconoce dianas infectadas con vvF y vvF-ΔF2. Ensayo de citotoxicidad realizado con CTL F/F249-257 como efectoras y células P13.1 infectadas con vvF (■) o vvF-ΔF2 (□), o infectadas con el virus parental WR en presencia (●) o no (△) del péptido F249-257 como dianas.

Por el contrario, con los otros péptidos predichos en la subunidad F1 de la proteína F (F365-373 y F467-475) (**Tabla IV**) no se observó reconocimiento de dianas pulsadas con péptido por la línea multispecífica CTL F/BCH4 (**Fig. 17**). En el caso de F467-475, también se intentó generar sin éxito una línea monoespecífica de CTL a partir de esplenocitos de ratones infectados con vvF (datos no mostrados). Además, consideramos la posibilidad de que existiesen otros epítomos en la subunidad F2. Sin embargo, un epítipo predicho en la región delecionada en vvF-ΔF2 representado por los péptidos sintéticos F31-40 y F32-40 también fue ensayado, resultando negativo (**Fig. 17**).

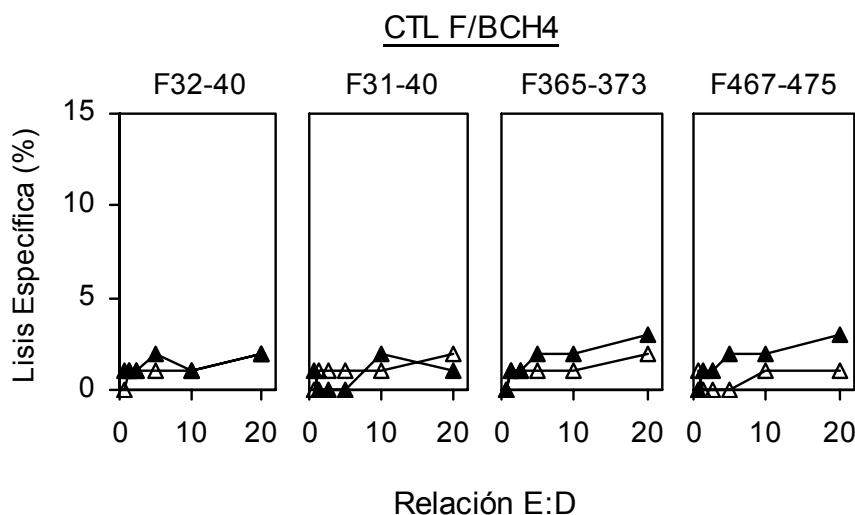


Figura 17. Péptidos de la proteína F que fueron predichos como epítomos presentados por K^d pero que no fueron reconocidos por CTL F/BCH4. Ensayos de citotoxicidad realizados con la línea multispecífica CTL F/BCH4 con dianas P13.1 pulsadas con una concentración de 10⁻⁵ M de los péptidos indicados (▲) o sin péptido (△). Se controló el reconocimiento por CTL F/BCH4 de las mismas dianas pulsadas con el péptido F85-93.

El conjunto de estos resultados se resume en la **Figura 18**. Aunque algunos de los péptidos más probables según los algoritmos de predicción de epítomos no resultaron reconocibles por CTL, no podemos excluir la posibilidad remota de que existan otros epítomos en la proteína F de VRS Long no identificados adecuadamente con estos algoritmos.



Figura 18. Epítomos reconocidos por CTL en la proteína F de VRS Long. Los epítomos reconocidos por CTL (▲) presentados por K^d identificados en este estudio en la proteína F de VRS Long son F85-93 (en la subunidad F2, con secuencia KYKNAVTEL) y F249-258 (en la subunidad F1, con secuencia TYMLTNSELL). Los péptidos predichos como epítomos presentados por K^d que no fueron reconocidos por CTL también aparecen indicados (▽). Sus secuencias son F31-40: EFYQSTCSAV, F32-40: FYQSTCSAV, F92-106: ELQLLMQSTPAANNR, F365-373: VFCDTMNSL, y F467-475: LYVKGEPII.

4.1.3. Generación *in vitro* de líneas de CTL específicas de los epítomos F85-93 y F249-258 a partir de ratones infectados con VRS.

Con objeto de determinar si en la respuesta inmune *in vivo* a VRS se generan linfocitos T CD8⁺ frente al epítipo F249-258, se utilizó como aproximación metodológica la generación *in vitro* de líneas de CTL. Así se pudo establecer una línea monoespecífica CTL VRS/F249-258 estimulando con péptido F249-258 esplenocitos de ratones infectados por vía intranasal con VRS Long. De la misma manera se generaron las líneas CTL VRS/F85-93 y CTL VRS/M2₈₂₋₉₀, pero estimulando los esplenocitos con los péptidos descritos F85-93 y M2₈₂₋₉₀, respectivamente. Se probaron diferentes concentraciones de péptido para el establecimiento de las líneas (datos no mostrados). Se realizaron ensayos de citotoxicidad con las líneas anteriores y con células BCH4 como dianas infectadas con VRS, o células P13.1 pulsadas o no con un exceso de cada uno de los péptidos (**Fig. 19a**). Las líneas monoespecíficas de epítomos de la proteína F, CTL VRS/F85-93 y CTL VRS/F249-258, mostraron una peor actividad citotóxica frente a las dianas pulsadas con péptido y no reconocieron dianas infectadas con VRS. Sin embargo, la línea CTL VRS/M2₈₂₋₉₀ tuvo una eficiente actividad citotóxica frente a dianas pulsadas con péptido y dianas BCH4 infectadas con VRS. En ensayos de titulación de cada uno de los péptidos también se observó una peor actividad citotóxica de las líneas monoespecíficas de epítomos de la proteína F (**Fig. 19b**).

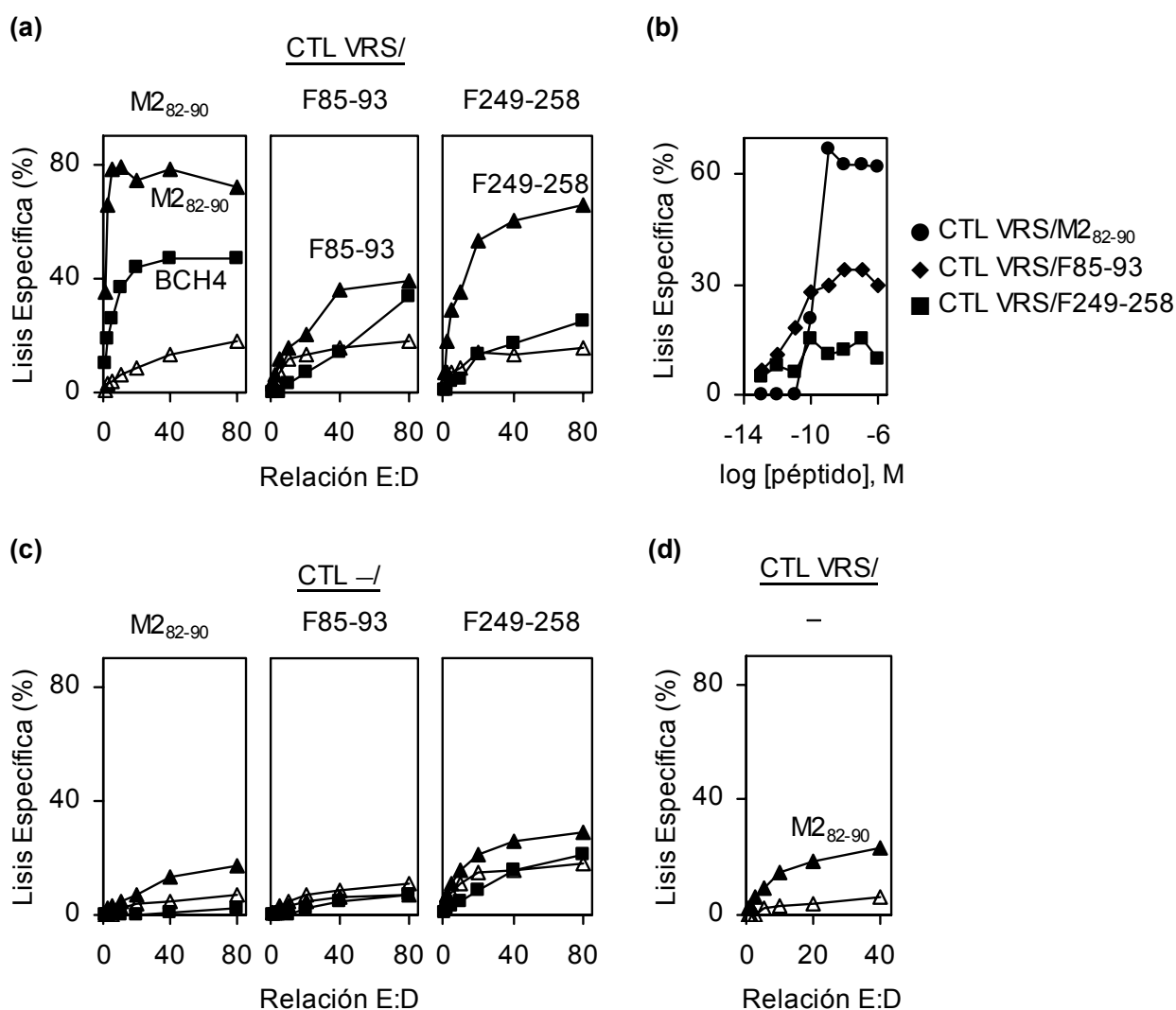


Figura 19. Generación *in vitro* de líneas CTL VRS/M2₈₂₋₉₀, CTL VRS/F85-93 y CTL VRS/F249-258 a partir de ratones infectados con VRS. (a) Se estimularon esplenocitos de ratones infectados con VRS Long con los péptidos indicados para generar las líneas CTL VRS/M2₈₂₋₉₀, CTL VRS/F85-93 y CTL VRS/F249-258. En la estimulación de las líneas CTL VRS se utilizó una concentración de péptido de 10^{-9} M para M2₈₂₋₉₀ y F249-258, y de 10^{-10} M para F85-93. Las líneas CTL VRS se utilizaron como efectoras en ensayos de citotoxicidad realizados con dianas P13.1 pulsadas con los péptidos correspondientes (▲) o sin péptido (△), o con dianas BCH4 (■). (b) Ensayo de titulación mediante citotoxicidad realizado a una relación E:D 20:1 con dianas P13.1 pulsadas con concentraciones crecientes de cada uno de los correspondientes péptidos, y las líneas CTL VRS como células efectoras. (c) Como control negativo se estimularon esplenocitos de ratones BALB/c sin infectar con los péptidos indicados, y se utilizaron como efectoras en un ensayo de citotoxicidad realizado con las mismas dianas del apartado (a). (d) Como control negativo adicional se dejaron sin estimular con péptido los esplenocitos de ratones infectados con VRS Long utilizados para generar las líneas CTL VRS de los apartados (a) y (b), y se utilizaron como efectoras en un ensayo de citotoxicidad realizado con dianas P13.1 pulsadas con el péptido M2₈₂₋₉₀ (▲) o sin péptido (△).

Es importante señalar que las líneas de CTL específicas de epítomos de la proteína F no se pudieron generar por activación primaria *in vitro*, ya que no se generaron CTL con actividad citotóxica al estimular esplenocitos de ratones BALB/c no infectados con los péptidos F85-93, F249-258 o M2₈₂₋₉₀ (Fig. 19c). De la misma forma, tampoco se pudieron

generar CTL al estimular sólo con IL2 los esplenocitos de ratones infectados con VRS utilizados en la generación de las líneas CTL VRS/F85-93, CTL VRS/F249-258 y CTL VRS/M2₈₂₋₉₀ (**Fig. 19d**).

La relativa debilidad de los CTL específicos de la proteína F era esperada ya que en la respuesta inmune frente a VRS mediada por CTL se sabe que la proteína M2 es inmunodominante. Sin embargo, mediante la reestimulación *in vitro* es posible determinar la presencia de poblaciones de linfocitos T CD8⁺ específicas de F249-258 en ratones infectados con VRS Long. De este modo podemos concluir que en la infección natural de los ratones BALB/c con VRS por una vía local, la vía intranasal, hay una inducción de CTL específicos de todos los epítomos estudiados, en particular del nuevo epítomo definido por nosotros F249-258, que se puede detectar incluso a nivel sistémico. Además, estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de inmunizar ratones con vvF para la inducción eficiente de linfocitos T CD8⁺ específicos de epítomos de la proteína F de VRS.

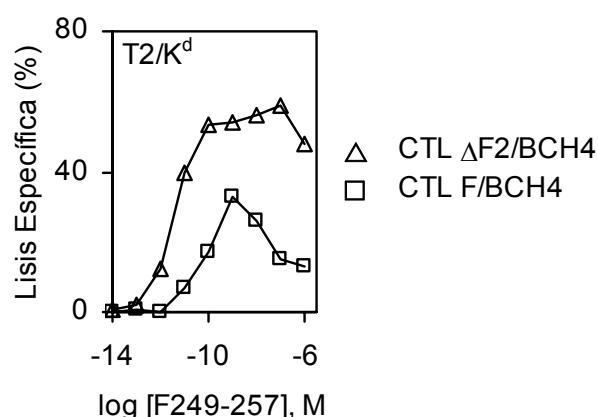
4.2. INMUNODOMINANCIA DEL EPÍTOPO F85-93 SOBRE EL EPÍTOPO F249-258 EN LÍNEAS DE CTL GENERADAS *IN VITRO* Y EN LA INFECCIÓN DE RATONES *IN VIVO*.

4.2.1. Inmunodominancia del epítipo F85-93 sobre el epítipo F249-258 en líneas de CTL generadas *in vitro*.

Los epítopos F85-93 y F249-258 derivan de la misma proteína, la glicoproteína F de VRS humano, y son presentados por el mismo alotipo de MHC de clase I, K^d, por lo tanto existe la posibilidad de que compitan entre sí por su presentación a CTL. De hecho, al comparar los ensayos de titulación de péptido mediante citotoxicidad realizados con la línea multispecífica CTL F/BCH4, se observó un comportamiento diferente en el reconocimiento de los péptidos F85-93 (**Fig. 10d**) y F249-257/8 (**Fig. 14**): la línea CTL F/BCH4 reconoció dianas pulsadas con concentraciones más bajas del péptido F85-93 y mostró valores superiores de lisis específica que en la titulación de F249-257/8. Así pues parece que en la línea CTL F/BCH4 se habrían seleccionado más o mejores CTL específicos del epítipo F85-93 que del epítipo F249-258.

Por otra parte, en ausencia de clones de linfocitos T específicos del epítipo F85-93, en la línea CTL Δ F2/BCH4 (ver **Tabla II** en Materiales y Métodos, página 30), se lisaron eficientemente dianas pulsadas con concentraciones de F249-257 de hasta 10^{-11} M (**Fig. 20**). Por lo tanto, el límite en el reconocimiento del péptido F249-257 por CTL F/BCH4 estaría impuesto por la presencia de clones de linfocitos T específicos de F85-93, y no por las células BCH4, ya que éstas fueron capaces de seleccionar CTL más sensibles cuando estimularon esplenocitos de ratones infectados con vvF- Δ F2. Así, parece que F249-258 sería un epítipo subdominante en presencia de F85-93, que se comportaría como epítipo inmunodominante.

Figura 20. Diferente reconocimiento por líneas de CTL del péptido F249-257. Se pulsaron células T2/K^d con concentraciones crecientes de péptido F249-257, y se realizó un ensayo de titulación mediante citotoxicidad a la relación E:D 5:1 usando la línea CTL Δ F2/BCH4 (Δ) o la línea multispecífica CTL F/BCH4 (\square) como efectoras (ver **Tabla II**, página 30).



La reducida sensibilidad en el reconocimiento de epítipo, o la menor cantidad de clones de CTL específicos de F249-257/8 presentes en la línea CTL F/BCH4, se evidenció de nuevo al observar un patrón distinto de reconocimiento a bajas E:D en un ensayo de

citotoxicidad realizado con CTL F/BCH4 y dianas infectadas. En la **Figura 21** se indican con una flecha las relaciones E:D no saturadas, a las cuales sólo se observaron valores de lisis específica elevados con las dianas que presentaron el epítipo inmunodominante F85-93, tanto en células pulsadas con péptido como infectadas con vvF. Las diferencias en el reconocimiento no se debieron a diferencias en la eficiencia de presentación antigénica a partir de vvF y vvF- Δ F2, ya que las **Figuras 16** y **12c** muestran que ambos rVV fueron capaces de presentar igualmente el epítipo subdominante a CTL F/F249-257 o a CTL Δ F2/BCH4, líneas de CTL que carecen de clones de linfocitos T específicos de F85-93 (ver **Tabla II**, página 30).

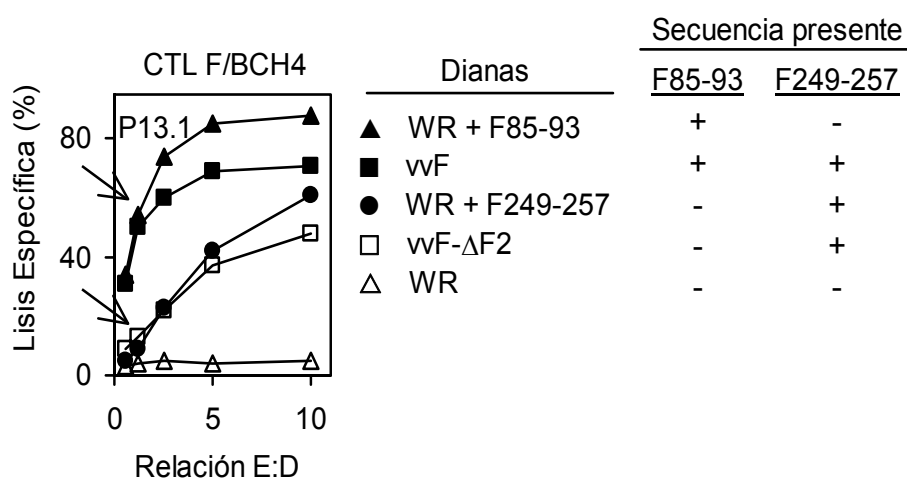


Figura 21. Diferente reconocimiento por la línea CTL F/BCH4 de células que presentan F85-93 y/o F249-257. Ensayo de citotoxicidad realizado con CTL F/BCH4 como efectoras y dianas P13.1 infectadas con vvF (■) o vvF- Δ F2 (□); o infectadas con WR en presencia de F85-93 (▲) o F249-257 (●) como controles positivos; o con WR (△) como control negativo. Las flechas indican las diferencias observadas a relaciones E:D no saturadas. A la derecha del gráfico se indica para cada diana la presencia (+) o ausencia (-) de las secuencias F85-93 o F249-257.

Para estudiar si las respuestas dirigidas frente al epítipo inmunodominante F85-93 impedían la emergencia de respuestas frente al epítipo subdominante F249-257/8, se cuantificaron en las líneas de CTL estimuladas con células BCH4 los linfocitos T CD8⁺ específicos de cada epítipo mediante ensayos de tinción intracelular de citoquinas (ICS, *intracellular cytokine staining*). Este ensayo permite cuantificar por citometría el número de linfocitos T CD8⁺ activados que producen IFN γ , el cual se acumula intracelularmente debido a la presencia de BFA en el cultivo. Los ensayos de ICS se realizaron utilizando células pulsadas con péptido para activar las líneas CTL F/BCH4 y CTL Δ F2/BCH4 (**Fig. 22**).

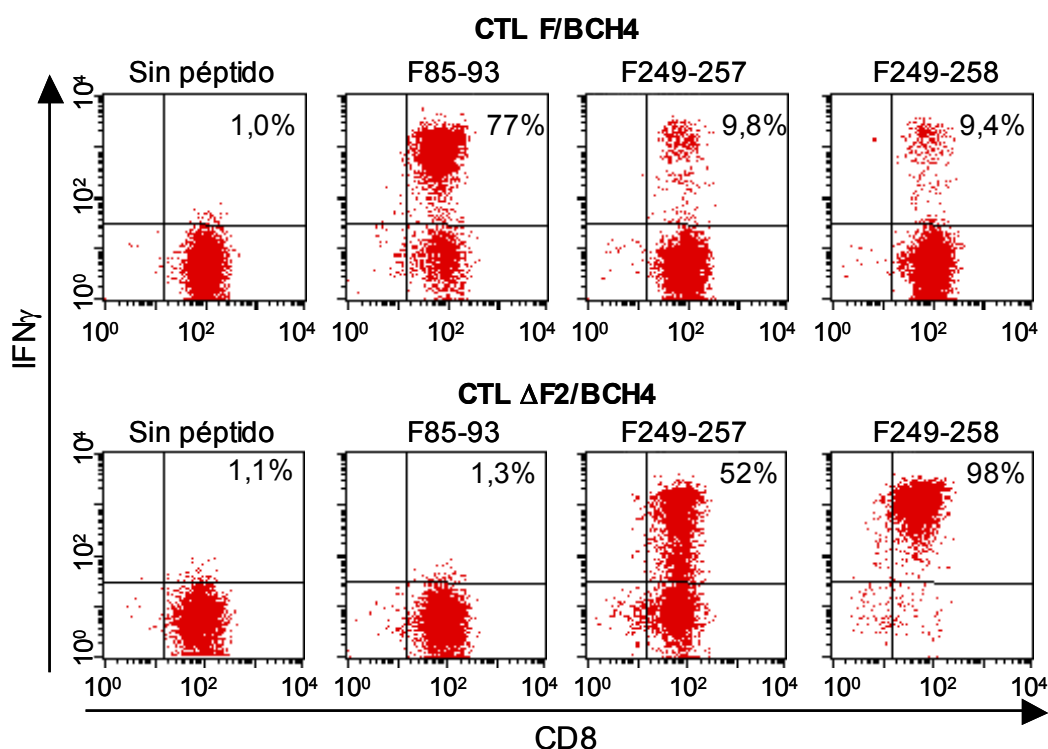


Figura 22. Cuantificación de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ que responden a F85-93 y F249-257/8 en líneas de CTL. Se realizaron ensayos de ICS activando CTL con péptidos sintéticos en presencia de BFA para acumular IFN γ intracelularmente. Las células se tiñeron con mAb anti-CD8 y anti-IFN γ . Las líneas CTL F/BCH4 (paneles superiores) y CTL ΔF2/BCH4 (paneles inferiores) se activaron con células P13.1 preincubadas con los péptidos indicados. En el cuadrante superior derecho se muestra el porcentaje del total de linfocitos CD8⁺ que se tiñeron con anti-IFN γ . En cada muestra se analizaron más de 8.000 células CD8⁺.

La **Figura 22** (paneles superiores) muestra que cuando las dianas se pulsaron con péptido F85-93, un 77% de los linfocitos CD8⁺ presentes en la línea CTL F/BCH4 fueron activados para producir IFN γ , mientras sólo un 9,8 y un 9,4% de los linfocitos CD8⁺ fueron activados por los péptidos F249-257 y F249-258, respectivamente. Por lo tanto, las líneas de CTL obtenidas *in vitro* a partir de ratones infectados con vvF que han alcanzado la fase de memoria muestran inmunodominancia, ya que las respuestas de CTL están fuertemente desviadas hacia el epítipo F85-93, en detrimento de las respuestas dirigidas a F249-257/8. Es interesante destacar que cuando el epítipo inmunodominante F85-93 estaba ausente en la fase de inducción *in vivo* que llevó a la generación de la línea CTL ΔF2/BCH4, se alcanzó un 52 y un 98% de activación con los péptidos F249-257 y F249-258, respectivamente, mostrando que en ausencia del epítipo F85-93, las respuestas al epítipo F249-257/8 se generan muy eficientemente. Así pues, al generar líneas de CTL *in vitro* no hay una limitación en la disponibilidad de linfocitos T CD8⁺ capaces de responder a F249-257/8.

4.2.2. Inmunodominancia del epítipo F85-93 sobre el epítipo F249-258 en la infección de ratones con vvF *in vivo*.

La jerarquía en las respuestas primaria, de memoria y secundaria de linfocitos T CD8⁺ frente a F85-93, F249-257 y F249-258, se estudió *in vivo* tras la infección con vvF (**Fig. 23**). Las frecuencias de linfocitos CD8⁺ activados con péptidos que se observaron en ensayos de ICS fueron similares a las observadas en otros sistemas (Chen y col. 2000). Los resultados fueron esencialmente los mismos al utilizar tetrámeros K^d/F85-93 y K^d/F249-258, marcados con un fluorocromo y reconocidos específicamente por el TCR del CTL específico ya que contienen un grupo de cuatro complejos de moléculas de K^d con péptido (datos no mostrados). La cuantificación se realizó mediante ICS porque observamos cierta variabilidad y falta de sensibilidad en la tinción con el tetrámero K^d/F249-258.

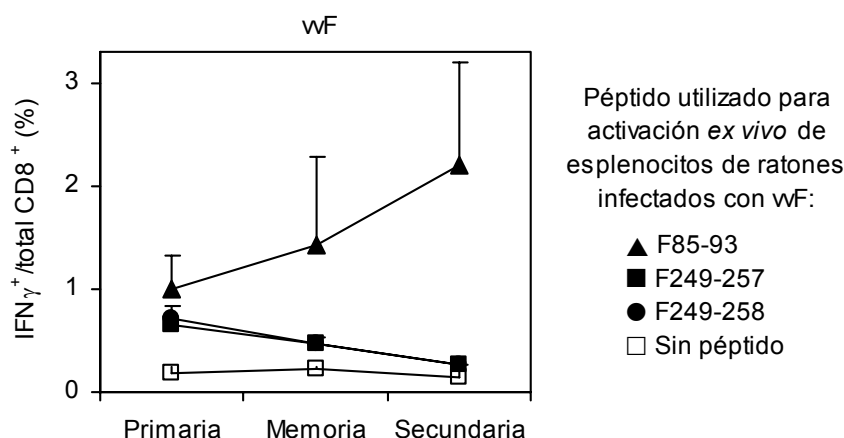


Figura 23. Poblaciones de linfocitos T CD8⁺ que responden a F85-93 y F249-257/8 tras la infección con vvF *in vivo*. Ensayos de ICS realizados activando esplenocitos con péptidos sintéticos. Los esplenocitos se obtuvieron de ratones 7 días tras la infección con 10⁷ u.f.p. de vvF para estudiar la respuesta primaria (se representa la media de 10 ratones de 5 experimentos independientes). La respuesta de memoria se estudió en ratones que recibieron una dosis idéntica de vvF 3 semanas después, y que fueron analizados después de varios meses (media de 2 ratones de 2 experimentos independientes). La respuesta secundaria se estudió en animales del grupo de memoria 7 días tras una tercera dosis idéntica de vvF (media de 2 ratones de 2 experimentos independientes). Se representa la media y la desviación estándar del porcentaje total de linfocitos CD8⁺ que se tiñeron con anti-IFN γ tras la activación con cada péptido. En cada muestra se analizó una media de 50.000 células CD8⁺.

Los resultados muestran que en la respuesta primaria frente a vvF (**Fig. 23**) no existe una limitación en la generación de una respuesta de linfocitos T CD8⁺ igualmente efectiva frente a cada epítipo, ya que las frecuencias fueron comparables para cada péptido, concluyendo pues que no existe una jerarquía significativa *in vivo* en la respuesta primaria en ratones infectados con vvF. Sin embargo, las frecuencias de poblaciones específicas de epítipo en la respuesta inmune de memoria se incrementaron para F85-93 y disminuyeron

para F249-257/8 en comparación con lo observado en la respuesta inmune primaria. Por lo tanto, en los ratones infectados con vvF, que han alcanzado la fase de memoria y cuyos esplenocitos se emplean para la selección *in vitro* de líneas de CTL mediante reestimulación con células BCH4, la población de linfocitos T CD8⁺ específicos de F85-93 ya se encuentra en ventaja. Esta diferencia es amplificada probablemente durante la reestimulación con células BCH4 hasta la observada en la línea CTL F/BCH4 (**Fig. 22**).

Además, esta tendencia se consolida *in vivo* en una respuesta inmune secundaria (**Fig. 23**), donde la media del porcentaje de linfocitos CD8⁺ activados por el péptido F85-93 es casi 10 veces superior a la observada tras activar con los péptidos F249-257 y F249-258. Esta diferencia en número es semejante a la observada en la línea establecida CTL F/BCH4 generada *in vitro* (**Fig. 22**). Por lo tanto, la línea CTL F/BCH4 es representativa de una respuesta secundaria *in vivo* a la infección con vvF. Concluimos que en la respuesta inmune *in vivo* mediada por linfocitos T CD8⁺ tras la infección con vvF se va estableciendo gradualmente una inmunodominancia del epítipo F85-93 sobre el epítipo F249-258.

4.2.3. Los epítipos F85-93 y F249-258 son ambos subdominantes en la infección de ratones con VRS Long *in vivo*.

Para cuantificar en la infección *in vivo* con VRS las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ frente a los epítipos F85-93 y F249-258 de la proteína F, se realizaron ICS *ex vivo* con esplenocitos de ratones infectados por vía intranasal con VRS Long. La **Figura 24** muestra que en la respuesta primaria sistémica en bazo frente a una infección local con VRS Long, existe una fuerte limitación en la generación de una respuesta de linfocitos T CD8⁺ frente a ambos epítipos de la proteína F, en comparación con la respuesta dirigida a la proteína inmunodominante de VRS, M2. Las casi indetectables frecuencias no permiten concluir si existe una jerarquía *in vivo* en la respuesta primaria sistémica entre epítipos de la proteína F en ratones infectados localmente con VRS Long.

Además se intentó evaluar la respuesta primaria local en pulmón frente a epítipos de la proteína F realizando lavados broncoalveolares en ratones infectados por vía intranasal con VRS Long. Sin embargo, no se obtuvo un número suficiente de células que permitiese evaluar la respuesta de linfocitos T CD8⁺ dirigida hacia los epítipos F85-93 y F249-258 de la proteína F mediante ICS, además de controlar la respuesta frente al epítipo inmunodominante M2₈₂₋₉₀ (datos no mostrados).

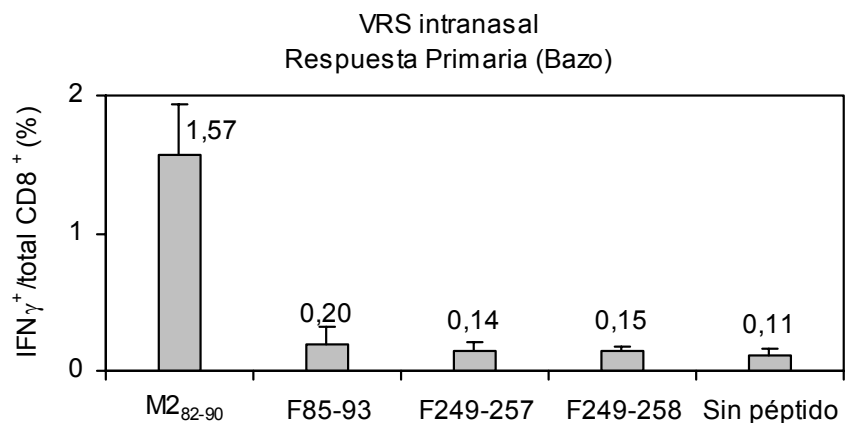


Figura 24. Respuesta primaria de linfocitos T CD8⁺ a la infección *in vivo* con VRS Long.

Se realizaron ensayos de ICS activando esplenocitos con péptidos sintéticos. Para estudiar la respuesta primaria los esplenocitos se obtuvieron de ratones 7 días tras la infección intranasal con 10⁶ u.f.p. de VRS Long. Se representa el porcentaje total de linfocitos CD8⁺ que se tiñeron con anti-IFN γ tras la activación con cada péptido. Se muestra la media y la desviación estándar de 4 ratones de dos ensayos independientes. En cada muestra se analizó una media de 40.000 células CD8⁺.

4.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE LOS EPÍTOPOS F85-93 Y F249-258*.

4.3.1. Procesamiento endógeno e independiente de TAP de epítomos presentados por K^d a CTL F/BCH4 en células infectadas con rVV.

La eficiencia del procesamiento de los antígenos es uno de los factores que pueden contribuir al establecimiento de un determinado patrón de inmunodominancia, por lo cual quisimos estudiar el procesamiento y presentación de los epítomos F85-93 y F249-258. En primer lugar investigamos si existe presentación independiente de TAP, ya que se ha observado en otras proteínas de paramixovirus. Para ello se infectaron con vvF células T2/K^d deficientes en TAP, y se realizaron ensayos de citotoxicidad con la línea multiespecífica CTL F/BCH4 y las líneas monoespecíficas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-257 (**Fig. 25**). Los porcentajes de lisis fueron muy inferiores a los observados anteriormente con células P13.1 infectadas, por lo que se representa la media de varios experimentos. Se observaron mayores porcentajes de lisis de las dianas T2/K^d infectadas con vvF con la línea CTL F/BCH4, que reconoce a ambos epítomos F85-93 y F249-258, aunque mayormente al epítomo F85-93. Las líneas monoespecíficas mostraron valores de lisis específica inferiores, sobre todo en el caso de la línea CTL F/F249-257. Estos resultados sugieren que al menos el epítomo F85-93 se presenta por una vía independiente de TAP al infectar células con un rVV que codifica la proteína F de VRS Long. En el caso de la existencia de presentación independiente de TAP del epítomo F249-258 los datos no son suficientemente claros.

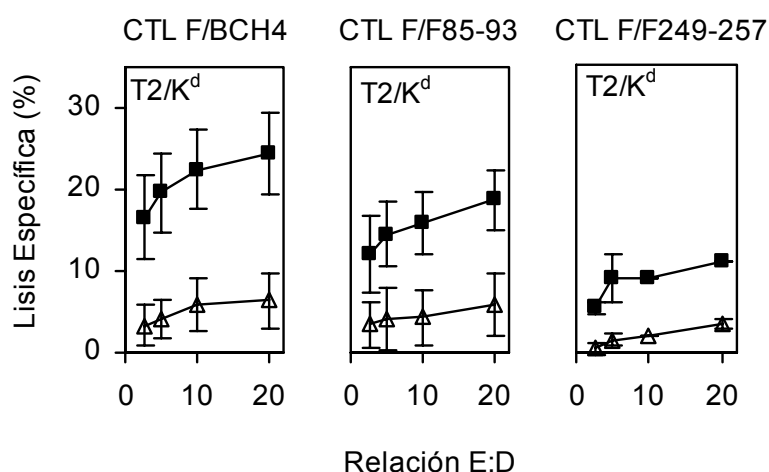


Figura 25. Presentación independiente de TAP de epítomos de la proteína F presentados por K^d. Ensayos de citotoxicidad realizados con líneas CTL F/BCH4, CTL F/F85-93 y CTL F/F249-257 como efectoras, y dianas T2/K^d infectadas durante la noche con vvF (■) o con el control negativo WR (△). Se representa el promedio de porcentajes de lisis específica de 2 a 13 ensayos independientes, junto con la desviación estándar.

*Los resultados de este apartado se resumen en la **Tabla V** de Discusión, página 75.

A fin de estudiar la naturaleza endógena o exógena de la presentación independiente de TAP observada en la **Figura 25**, se realizaron ensayos de citotoxicidad con células T2/K^d infectadas con vvF en presencia o no de BFA, metabolito que inhibe específicamente el transporte anterógrado en la vía secretoria endógena. Los ensayos se realizaron con la línea CTL F/BCH4 ya que fue la única con la que se observaron valores de lisis específica concluyentes. En la **Figura 26a** se observa inhibición del reconocimiento por CTL F/BCH4 de las dianas T2/K^d infectadas con vvF en presencia de BFA.

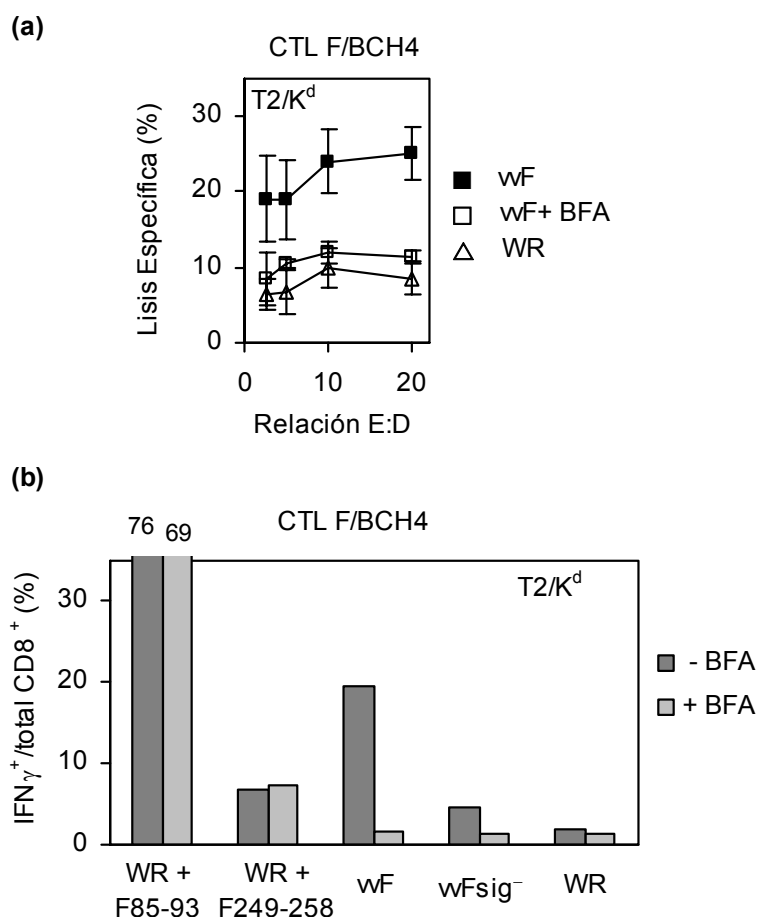


Figura 26. Presentación endógena independiente de TAP de epítomos de la proteína F presentados por K^d a CTL F/BCH4. (a) Ensayo de citotoxicidad realizado utilizando CTL F/BCH4 como efectoras y dianas T2/K^d infectadas durante la noche con vvF en ausencia de BFA (■) o en presencia de BFA (□), o con WR (△) como control negativo. Se representa el promedio de porcentajes de lisis específica de dos ensayos. El porcentaje medio de inhibición específica fue 80%. (b) Ensayo de ICS realizado con CTL F/BCH4 y dianas T2/K^d infectadas durante 6 h con los virus indicados, en presencia o ausencia de BFA. El virus vvFsig⁻ codifica una forma citosólica de la proteína F de VRS Long. Como control positivo se infectaron células T2/K^d con el virus parental WR en presencia de los péptidos F85-93 o F249-258. La inhibición específica de vvF por BFA fue 98%.

Además, debido a la mayor complejidad y variabilidad de los ensayos de citotoxicidad, también se realizaron ensayos de ICS con la línea CTL F/BCH4 y células T2/K^d infectadas con vvF en presencia o no de BFA (**Fig. 26b**). Mediante la técnica de ICS también

se observó inhibición por BFA de la presentación independiente de TAP a CTL F/BCH4. Estos resultados indican que hay presentación endógena independiente de TAP a CTL F/BCH4 de epítomos de la proteína F presentados por K^d , probablemente del epítomo F85-93. Con ambos métodos se controló la presentación de péptido sintético en presencia de BFA (datos no mostrados en **Fig. 26a**).

Como control adicional, las dianas T2/ K^d se infectaron con el virus vvFsig⁻ que codifica una forma citosólica de la proteína F en la que se ha deletado la secuencia señal (ver **Fig. 3** en Materiales y Métodos, página 27). En general, las proteínas de membrana o secretorias tienen una secuencia señal aminoterminal que permite la translocación cotraduccional de la proteína al RE a través del translocón, y que luego es recortada por la peptidasa señal en el RE. Algunas proteínas de membrana cuya secuencia señal no se recorta y no está identificada también acceden al RE a través del translocón, siendo la regla general que las proteínas que no tienen secuencia señal no tienen acceso a la vía secretoria endógena. De hecho, la experiencia en nuestro laboratorio es que las células T2 deficientes en TAP nunca han presentado epítomos a partir de proteínas citosólicas mientras sí lo hacían a partir de la proteína secretoria equivalente (Gil-Torregrosa y col. 1998; Gil-Torregrosa y col. 2000; y resultados no publicados). No obstante, en la **Figura 26b** las células T2/ K^d deficientes en TAP infectadas con el virus vvFsig⁻ fueron capaces de activar la línea CTL F/BCH4 por encima de los niveles observados con el virus parental WR. Por tanto los datos apuntan a que sorprendentemente epítomos presentados por K^d a CTL F/BCH4 podrían ser procesados y presentados independientemente de TAP a pesar del confinamiento citosólico de la proteína codificada por vvFsig⁻.

Al igual que ocurre con otras glicoproteínas a las que se elimina su secuencia señal (Townsend y col. 1986), se sabe que la proteína F que carece de secuencia señal se degrada rápidamente en las células infectadas y consecuentemente es prácticamente indetectable por inmunofluorescencia (Bembridge y col. 1999). Péptidos finales o precursores derivados del procesamiento de la proteína F citosólica podrían ser transportados al RE sólo si existiesen mecanismos independientes de TAP. Para controlar que el requerimiento de TAP para el transporte de cualquier péptido al RE es estricto en nuestro diseño experimental deficiente en TAP, las células T2/ K^d y T2/ K^d /TAP (T2/ K^d transfectadas con TAP), se infectaron con rVV codificando minigenes que expresan una miniproteína citosólica o una secretoria conteniendo tan sólo un epítomo mínimo de la nucleoproteína del virus de la gripe presentado por K^d . Como se esperaba, las células deficientes en TAP activaron a los CTL específicos correspondientes sólo cuando expresaron el epítomo secretorio, mientras que las células con TAP además activaron a los CTL específicos cuando expresaron el epítomo citosólico (**Fig. 27**). Debemos pues concluir que las células T2/ K^d no tienen fugas de péptidos citosólicos al RE, y considerar la posibilidad de que la proteína F citosólica o productos

derivados puedan entrar en compartimentos vesiculares por un mecanismo independiente de TAP y de secuencia señal, y accedan así a un compartimento en el que sea posible el procesamiento del epítipo presentado.

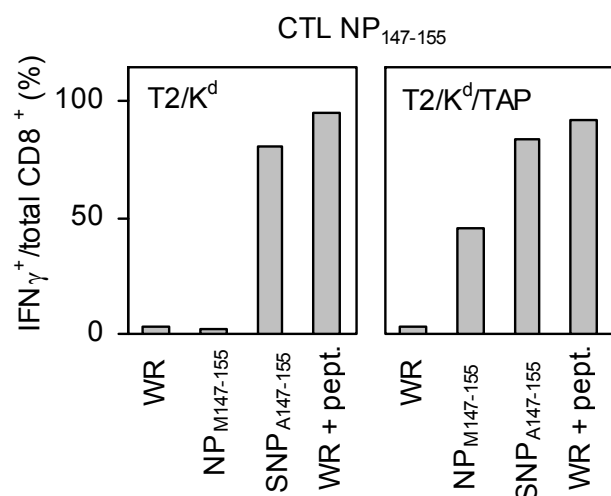


Figura 27. Las células T2/K^d no presentan péptidos citosólicos. Ensayo de ICS realizado con CTL específicos del epítipo de la nucleoproteína del virus de la gripe NP₁₄₇₋₁₅₅ presentado por K^d. Las dianas fueron células T2/K^d o T2/K^d/TAP infectadas a una m.o.i. de 3 durante 1 h con la cepa parental WR como control negativo, rVV codificando minigenes que expresan una miniproteína citosólica (NP_{M147-155}) o una secretoria (SNP_{A147-155}) conteniendo tan sólo el epítipo NP₁₄₇₋₁₅₅, o WR en presencia de péptido NP₁₄₇₋₁₅₅ como control positivo. Cuando la infección se desarrolló durante 3 h, las células T2/K^d tampoco presentaron la miniproteína citosólica NP_{M147-155}.

4.3.2. En células infectadas con rVV, ambos epítipos, F85-93 y F249-258, se presentan independientemente de TAP pero por vías diferentes.

Con el fin de obtener datos concluyentes sobre la presentación independiente de TAP de los epítipos F85-93 y F249-258, se sustituyeron por ensayos de ICS los ensayos de citotoxicidad realizados con las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-257. Se utilizó la línea CTL F/F249-258, en lugar de la línea CTL F/F249-257 específica del nonúmero, ya que el decámero F249-258 es reconocido por todos los CTL en la línea CTL Δ F2/BCH4 (paneles inferiores **Fig. 22**), lo cual sugiere que es probablemente un ligando natural de K^d, al menos en las células BCH4. La **Figura 28** aporta datos concluyentes ya que se observó activación tanto de la línea CTL F/F85-93 como de la línea CTL F/F249-258 en ensayos de ICS realizados con células T2/K^d infectadas con vvF. Estos resultados nos permiten concluir que en células infectadas con vvF ambos epítipos, F85-93 y F249-258, son presentados independientemente de TAP.

Cuando se hicieron ensayos de ICS con células deficientes en TAP expresando la forma citosólica de la proteína F, las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258 se comportaron de forma diferente (**Fig. 28**). La ausencia de activación de la línea CTL F/F85-93 por dianas T2/K^d infectadas con vvFsig⁻ es lo esperado, y sugiere que el epítipo F85-93 es procesado y presentado por una vía independiente de TAP que sigue la vía secretoria endógena inaccesible a la proteína F citosólica. Por el contrario, la activación de CTL F/F249-258 por las mismas dianas indica que el epítipo F249-258 puede ser procesado y presentado

independientemente de TAP a pesar del confinamiento citosólico de la proteína codificada por vvFsig⁻. Esta presentación independiente de TAP del epítipo F249-258 en células T2/K^d infectadas con vvFsig⁻ explica además la activación de CTL F/BCH4 observada en la **Figura 26b**, que fue similar a la observada con el péptido F249-258.

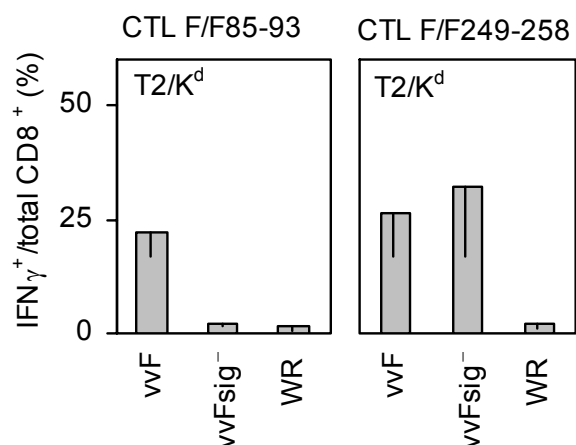


Figura 28. Presentación independiente de TAP de los epítipos F85-93 y F249-258 en células infectadas con rVV. Ensayos de ICS realizados activando las líneas CTL F/F85-93 o CTL F/F249-258 con células T2/K^d deficientes en TAP infectadas con el virus indicado. Se representa la media de datos obtenidos de entre 4 y 15 experimentos independientes.

De nuevo, para estudiar la naturaleza endógena o exógena de la presentación independiente de TAP de los epítipos F85-93 y F249-258, se realizaron infecciones en presencia de BFA. Se observó un distinto comportamiento en las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258 en ensayos de ICS (**Fig. 29**). La presentación independiente de TAP del epítipo F85-93 procesado a partir de la proteína F nativa codificada en rVV es endógena ya que se observó un 100% de inhibición específica por BFA. Sin embargo éste no es el caso para la presentación independiente de TAP del epítipo F249-258 procesado a partir de la proteína F nativa o citosólica ya que se observó poca inhibición específica por BFA. Se controló la presentación de concentraciones bajas de péptido sintético en presencia de BFA (datos no mostrados). Por otra parte, la existencia de antígeno preprocesado en el inóculo viral se minimiza siempre mediante la purificación parcial de los stocks de rVV. Así pues estos resultados indican que en células infectadas con vvF y vvFsig⁻ existe presentación exógena independiente de TAP del epítipo F249-258 a CTL. La ausencia de una resistencia total a BFA podría indicar la existencia además de una vía endógena de presentación independiente de TAP de F249-258.

Por tanto concluimos que cuando la proteína F está codificada en rVV los epítipos F85-93 y F249-258 son procesados y presentados en ausencia de TAP de forma diferente, siguiendo pues vías de procesamiento y presentación independientes de TAP distintas. El epítipo F85-93 sigue una vía independiente de TAP endógena (BFA^S), mientras que el epítipo F249-258 es procesado por una vía independiente de TAP fundamentalmente exógena (BFA^R) a la que tiene acceso una forma citosólica de la proteína F expresada por rVV.

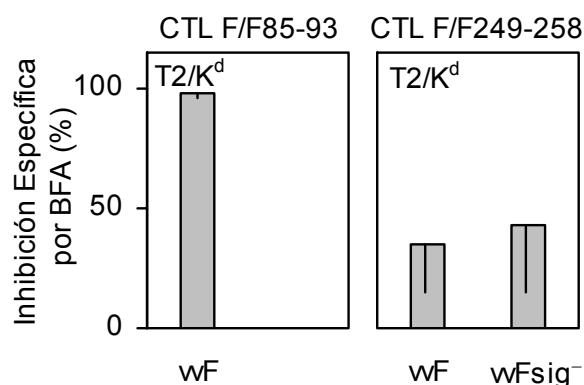


Figura 29. Las vías de presentación independiente de TAP de los epítomos F85-93 y F249-258 son diferentes en su inhibición por BFA. Se infectaron células T2/K^d con los virus indicados en presencia o ausencia de BFA. Se realizaron ensayos de ICS y se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido en presencia o no de BFA. Se indica el porcentaje de inhibición específica relativo a las mismas células infectadas en ausencia de BFA. Se representa la media de datos correspondientes a entre 5 y 8 experimentos independientes.

4.3.3. El epítipo F85-93 expresado en rVV es también procesado por el proteasoma en una vía de presentación dependiente de TAP, a diferencia del epítipo F249-258.

Continuamos el estudio del procesamiento y presentación de los epítomos F85-93 y F249-258 investigando la existencia de vías dependientes de TAP en células infectadas con rVV. Se infectaron con vvF y vvFsig⁻ las células T2/K^d/TAP y se realizaron ensayos de ICS con las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258 (**Fig. 30**). La integridad del epítipo F85-93 en la proteína Fsig⁻ se confirmó ya que la línea CTL F/F85-93, que no era activada por dianas deficientes en TAP infectadas con vvFsig⁻ (**Fig. 28**), se activó al disponer de TAP (**Fig. 30a**). La existencia de activación al infectar las dianas T2/K^d/TAP pero no las T2/K^d con vvFsig⁻, demuestra que existe una vía de presentación de F85-93 que es dependiente de TAP. Además, el fuerte incremento en la activación de CTL F/F85-93 por dianas T2/K^d/TAP infectadas con vvF en comparación con la activación observada con células T2/K^d deficientes en TAP e infectadas con vvF, indica que las vías dependientes de TAP contribuyen significativamente, junto a vías independientes de TAP, a la presentación del epítipo F85-93. Estas diferencias no se observaron para la línea CTL F/F249-258 (comparar **Fig. 28** y **Fig. 30a**).

La dependencia de una vía secretoria intacta se estudió de nuevo mediante la BFA, controlando la presentación de concentraciones bajas de péptido sintético (datos no mostrados). La presentación del epítipo F85-93 es endógena ya que cuando las células T2/K^d/TAP se infectaron con vvF y vvFsig⁻ en presencia de BFA se observó una inhibición específica total (**Fig. 30b**). La presentación del epítipo F249-258 a partir de las proteínas F nativa o citosólica en células T2/K^d/TAP de nuevo no fue completamente sensible a BFA. La inhibición específica observada fue sin embargo superior a la observada en células T2/K^d

deficientes en TAP, sugiriendo débilmente pero no demostrando la existencia de una vía endógena dependiente de TAP para el epítipo F249-258.

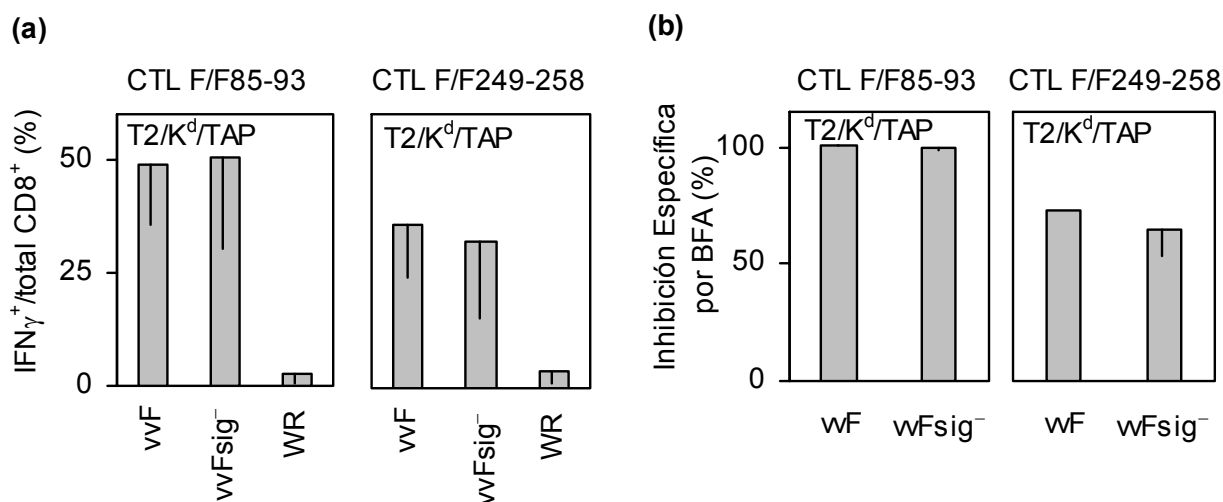


Figura 30. Presentación de los epítipos F85-93 y F249-258 en células que expresan TAP y fueron infectadas con rVV. (a) Se realizaron ensayos de ICS con células T2/K^d/TAP infectadas con el virus indicado y las líneas CTL F/F85-93 o CTL F/F249-258. Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido. Los datos representados corresponden a la media de 4 a 8 experimentos independientes. (b). Se infectaron células T2/K^d/TAP con el virus indicado en presencia de BFA, y se realizaron ensayos de ICS controlando la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido en presencia o no de BFA. Se representa el porcentaje de inhibición específica correspondiente a datos de uno a tres experimentos independientes.

Con objeto de investigar si el proteasoma participa en el procesamiento de los epítipos de la proteína F de VRS, se realizaron ensayos con el inhibidor específico del proteasoma lactacistina (LC) (Craiu y col. 1997). Se infectaron células T2/K^d/TAP con vvF y vvFsig⁻ en presencia de LC y se realizaron ensayos de ICS con las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258. Se controló la presentación de concentraciones bajas de péptido sintético en presencia de LC (datos no mostrados). La **Figura 31** muestra que al llevar a cabo la infección en presencia de LC de nuevo se observó un distinto comportamiento de las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258. No hubo efecto significativo de LC en la activación de CTL F/F249-258, por lo que no tenemos datos que apoyen una presentación del epítipo F249-258 por una vía dependiente del proteasoma. Por el contrario, la activación de CTL F/F85-93 fue inhibida por LC. De este modo podemos concluir que el epítipo F85-93 se presenta por la vía clásica de presentación dependiente de TAP que implica la degradación por el proteasoma.

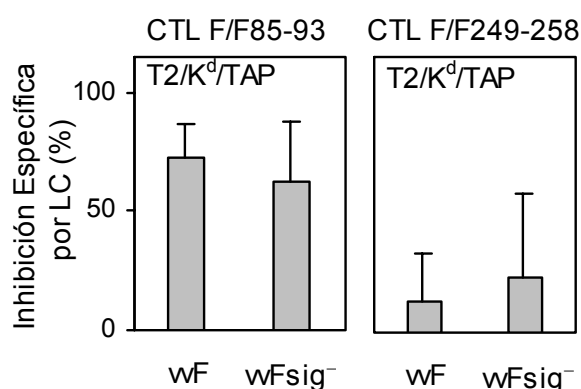


Figura 31. La presentación del epítipo F85-93, a diferencia del epítipo F249-258, en células que expresan TAP y que fueron infectadas con rVV es dependiente del proteasoma. Se infectaron células T2/K^d/TAP con el virus indicado en presencia del inhibidor específico del proteasoma LC. Se realizaron ensayos de ICS controlando la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido en presencia o no de LC. Se representa el porcentaje de inhibición específica correspondiente a datos de tres a cuatro experimentos independientes.

4.3.4. Presentación endógena independiente de TAP de F85-93 en células infectadas con rVV.

En células con TAP cuando la proteína F está codificada en rVV la presentación del epítipo F85-93 tiene dos componentes endógenos (BFA^S): una vía clásica de presentación de antígeno mediada por el proteasoma (apartado 4.3.3.) y una vía independiente de TAP (apartado 4.3.2.). Para tener un control independiente adicional de la ausencia de fugas de péptidos precursores producidos por el proteasoma en nuestras células deficientes en TAP, se infectaron dianas T2/K^d con vvF en presencia de LC y se realizaron ensayos de ICS con la línea CTL F/F85-93 (**Fig. 32**). Se controló la presentación de concentraciones bajas de péptido sintético en presencia de LC (datos no mostrados). La LC no tuvo efecto en la activación de CTL F/F85-93, tal y como se esperaba, demostrando que el proteasoma no está implicado en la presentación endógena independiente de TAP del epítipo F85-93.

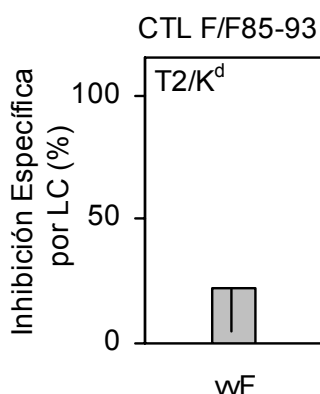


Figura 32. En células sin TAP la presentación del epítipo F85-93 no es dependiente del proteasoma. Se realizaron ensayos de ICS con CTL F/F85-93 y células T2/K^d infectadas con vvF en presencia de LC, controlando la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido en presencia o no de LC. Se representa la media de datos de dos experimentos independientes.

El virus VAFS2 codifica una proteína F con una mutación puntual en la posición 237 (indicada en la **Fig. 3** en Materiales y Métodos, página 27) que causa la retención de la proteína antes del compartimento intermedio del Golgi (López y col. 1996), por lo que si en

células infectadas con VAFS2 se observase presentación independiente de TAP del epítipo F85-93 se podría concluir que el epítipo se genera en los compartimentos tempranos de la vía secretoria. Sin embargo, al infectar células T2/K^d con el virus VAFS2 no se observó activación de la línea CTL F/F85-93 (**Fig. 33a**), por lo que no se pudo concluir en qué compartimento de la vía secretoria se genera el epítipo F85-93.

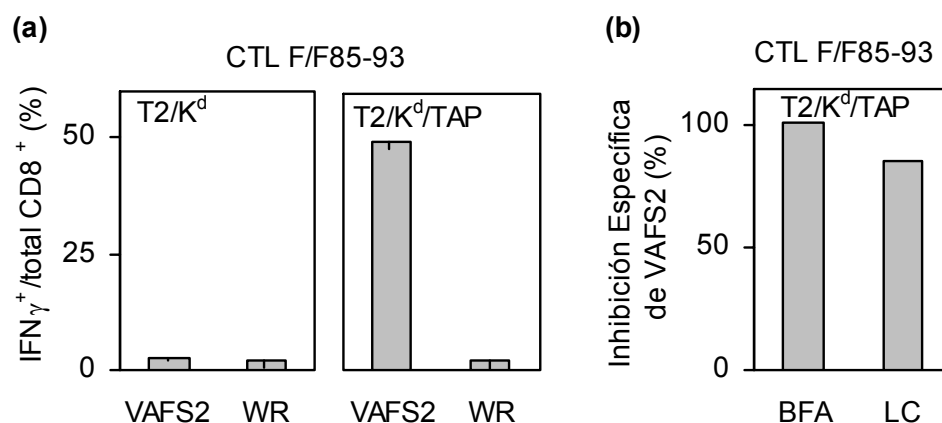


Figura 33. La presentación de F85-93 a partir de la proteína F retenida antes del compartimento intermedio del Golgi es dependiente de TAP. (a) Ensayos de ICS realizados con células T2/K^d o T2/K^d/TAP infectadas con el virus VAFS2 o el virus parental WR. VAFS2 codifica una forma de la proteína F que se retiene antes del compartimento intermedio del Golgi debido a una mutación puntual. Se representa el promedio de datos obtenidos en tres ensayos independientes. (b) Ensayo de ICS realizado con células T2/K^d/TAP infectadas con VAFS2 en presencia de BFA o del inhibidor específico del proteasoma LC. Se controló la activación de la línea CTL F/F85-93 por concentraciones bajas de péptido F85-93 en presencia o no de BFA o LC. Se representa el porcentaje de inhibición específica.

La ausencia de activación no permite concluir que el epítipo se genera en compartimentos posteriores al Golgi intermedio, ya que la mutación puntual en la proteína FS2 podría estar interfiriendo en su procesamiento en compartimentos tempranos de la vía secretoria. No obstante la integridad del epítipo F85-93 en la proteína mutante FS2 se controló al observar activación de CTL F/F85-93 en ensayos de ICS realizados con células T2/K^d/TAP infectadas con el virus VAFS2 (**Fig. 33a**). La presentación dependiente de TAP del epítipo F85-93 a partir de la proteína FS2 se inhibió al realizar la infección de células T2/K^d/TAP con VAFS2 en presencia de BFA o LC (**Fig. 33b**). Por lo tanto, en cuanto a la presentación de F85-93, la proteína FS2 se comporta igual que la proteína Fsig⁻ ya que la presentación es endógena, dependiente de TAP y del proteasoma.

El procesamiento de antígenos por la proteasa furina residente en TGN es uno de los mecanismos por los que se puede sortear el requerimiento de TAP. Además la proteína F madura naturalmente por acción de la furina para rendir las subunidades F1 y F2. Por lo tanto sería posible que la furina participase en el procesamiento independiente de TAP del epítipo F85-93 situado relativamente próximo al sitio I de corte por furina en el aa 109. Para

estudiar este aspecto se utilizaron varias aproximaciones en diferentes experimentos representados en la **Figura 34**.

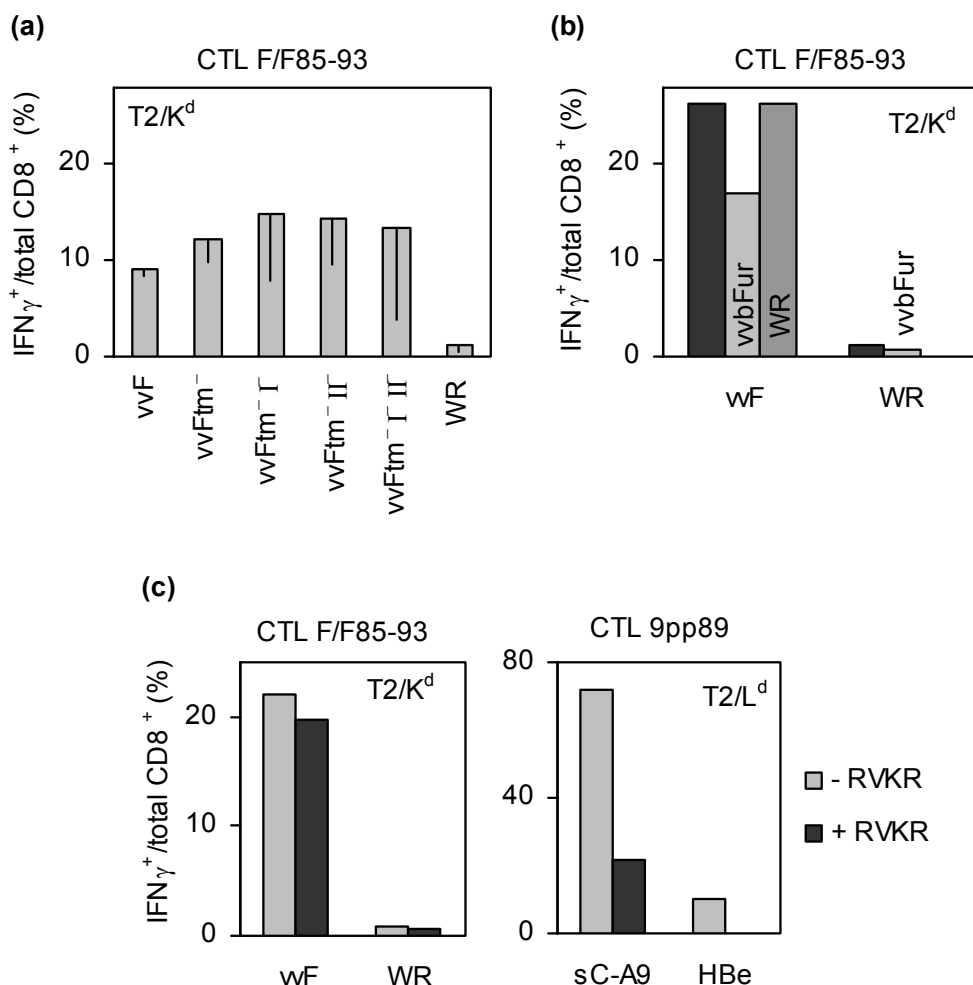


Figura 34. La presentación endógena e independiente de TAP del epítipo F85-93 no está mediada por furina. Se realizaron ensayos de ICS con CTL F/F85-93 y células T2/K d , excepto en el control de (c). **(a)** Las células se infectaron con los virus indicados. Se representa la media de dos experimentos independientes en los que la infección se realizó durante 4 ó 15 h. Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido. En uno de los experimentos además se realizó la infección con los diferentes virus en presencia de BFA y se observó una inhibición específica del 100%. **(b)** Las células se infectaron durante 5 h 30 min a una m.o.i. de 3 con vvF o WR, y se coinfectaron a una m.o.i. de 1 con el virus vvbFur que expresa la proteasa furina bovina o WR cuando se indica. Se muestran los datos de un ensayo representativo de 2. **(c)** Las células se infectaron con vvF o la cepa parental WR durante 6 h en presencia o no del inhibidor de furina decRVKR-cmk, indicado como RVKR. La inhibición específica fue del 10%. Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido. Se representan los datos de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. La inhibición del epítipo dependiente de furina 9pp89 codificado en el virus sC-A9 construido a partir del virus parental HBe se controló con los CTL correspondientes.

Se infectaron células T2/K d con una colección de rVV que expresan una serie de proteínas F secretadas, sin región transmembrana, en las que los sitios de procesamiento por furina se han mutado para interferir en la maduración de la proteína (esquemáticamente indicadas en la **Fig. 3** en Materiales y Métodos, página 27). La proteína codificada por vvFtm $^{-}$

fue reconocida por CTL F/F85-93 en niveles similares a vvF, indicando que la región transmembrana es dispensable para la presentación de este epítipo (**Fig. 34a**). La línea CTL F/F85-93 fue activada por las células T2/K^d infectadas con rVV que codifican la proteína F secretada sin cada uno (vvFtm⁻ I⁻, vvFtm⁻ II⁻) o sin ambos (vvFtm⁻ I⁻II⁻) sitios de furina. La presentación fue endógena ya que se inhibió por BFA (datos no mostrados). A pesar de que podría existir un procesamiento mínimo residual por proteasas tipo furina tras la delección $\Delta 131-134$ del virus vvFtm⁻ II⁻, nuestros resultados sugieren que el procesamiento por furina no es necesario para la presentación independiente de TAP del epítipo F85-93.

En experimentos adicionales, encontramos que el incremento de los niveles intracelulares de furina no potenció la presentación independiente de TAP del epítipo F85-93. La **Figura 34b** muestra que al coinfectar células T2/K^d con vvF y un rVV codificando la proteasa furina bovina (vvbFur), la línea CTL F/F85-93 no se activó tanto como al realizar la coinfección con vvF y el virus parental WR. De este modo, al incrementar los niveles intracelulares de furina se inhibe quizás la presentación independiente de TAP del epítipo F85-93 situado cerca del sitio I de furina.

Con el fin de seguir estudiando el posible papel de la furina en la presentación independiente de TAP endógena del epítipo F85-93, se utilizó el inhibidor decanoil-RVKR-clorometilcetona (decRVKR-cmk), un análogo de sustrato que inhibe específicamente a la furina y proproteín convertasas relacionadas (Garten y col. 1994). Observamos que la activación de CTL F/F85-93 no fue afectada por la presencia de decRVKR-cmk durante la infección (**Fig. 34c**, panel izquierdo). Se controló la presentación de concentraciones bajas de péptido sintético en presencia de decRVKR-cmk (datos no mostrados). Como control adicional, se comprobó que la presentación a partir de la proteína secretoria quimérica sC-A9 del epítipo dependiente de furina 9pp89 sí se inhibió con decRVKR-cmk (**Fig. 34c**, panel derecho, experimento realizado por S. Guil). El conjunto de los resultados mostrados en la **Figura 34** indican que el epítipo F85-93 no se presenta por la vía endógena independiente de TAP mediada por furina previamente descrita en nuestro laboratorio.

Finalmente, se investigó el requerimiento de aminopeptidasas que se sabe juegan un papel importante en el recorte de precursores peptídicos en el RE. Se realizaron infecciones en presencia de leucintiol (LeuSH), un potente inhibidor de aminopeptidasas capaz de inhibir entre otras a la aminopeptidasa de RE implicada en procesamiento de antígeno ERAP1 (Saric y col. 2002). Se controló la presentación de concentraciones bajas de péptido sintético en presencia de LeuSH (datos no mostrados). Se controló también la inhibición del epítipo NP₁₄₇₋₁₅₅ sensible a LeuSH (Guil y col. enviado), codificado como minigén que expresa una miniproteína secretoria en el virus SNP_{A147-155} (**Fig. 35**, panel derecho, experimento realizado por S. Guil). Sorprendentemente, se observó que se duplicó la activación de CTL F/F85-93 cuando se infectaron las dianas T2/K^d con vvF en presencia de LeuSH, es decir, el LeuSH

potenció la presentación antigénica de F85-93 (**Fig. 35**, panel izquierdo). Este resultado sugiere un posible papel destructor de ERAP en la vía de presentación independiente de TAP de F85-93.

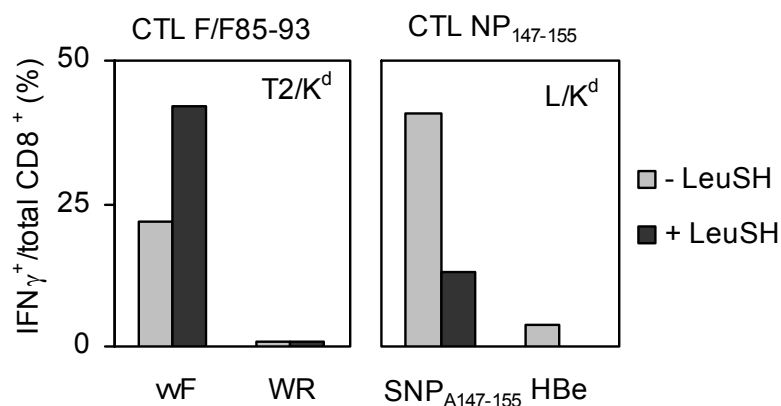


Figura 35. Aminopeptidasas sensibles a LeuSH interfieren en la presentación endógena e independiente de TAP del epítipo F85-93. Se realizaron ensayos de ICS con los CTL y dianas indicados. Las células se infectaron con los virus indicados en presencia o no del inhibidor de aminopeptidasas LeuSH. Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido. La potenciación específica de la presentación de vvF fue del 95% calculada a partir de la fórmula $100 \times \frac{[(X_i - X) - (WR_i - WR)]}{(X - WR)}$ donde X representa el porcentaje del total de linfocitos CD8⁺ que se tiñeron con anti-IFNγ cuando las dianas se infectaron con vvF, X_i es el valor cuando la infección se realizó en presencia del inhibidor, y WR y WR_i son los valores equivalentes cuando las dianas se infectaron con la cepa parental WR. Los datos corresponden a un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. Se controló en un ensayo de ICS realizado a E:D 10:1 la inhibición del epítipo sensible a LeuSH NP₁₄₇₋₁₅₅ codificado como miniproteína secretoria en el virus SNP_{A147-155}.

4.3.5. Presentación exógena e independiente de TAP de F249-258 en células infectadas con rVV.

En el apartado 4.3.2. hemos demostrado que el epítipo F249-258 se presenta independientemente de TAP por una vía exógena (BFA^R) cuando la proteína F está codificada en rVV. Para investigar si el epítipo está de hecho presente en el inóculo viral, que está parcialmente purificado, la infección de células T2/K^d no se dejó desarrollar tras una adsorción a 4°C (tiempo de infección 0 h). En la **Figura 36a** casi no se observa activación de CTL F/F249-258, demostrando que el transcurso de la infección es necesario para que se procese y presente el epítipo.

En el caso de epítopos de la proteína de membrana de latencia LMP2 del virus de Epstein-Barr (EBV), se ha descrito la entrada independiente de TAP al RE de péptidos hidrofóbicos generados por el proteasoma. Por consiguiente estudiamos si la presentación independiente de TAP del epítipo F249-258 dependía de la acción del proteasoma. Se infectaron células T2/K^d deficientes en TAP con vvF y vvFsig⁻ en presencia de LC y se realizaron ensayos de ICS con CTL F/F249-258 (**Fig. 36b**). Se controló la presentación de

concentraciones bajas de péptido sintético en presencia de LC (datos no mostrados). No hubo efecto significativo de LC sobre la activación de la línea CTL F/F249-258, demostrando que el proteasoma no participa en la presentación independiente de TAP del epítipo F249-258 desde ninguna de estas dos proteínas, F y Fsig⁻.

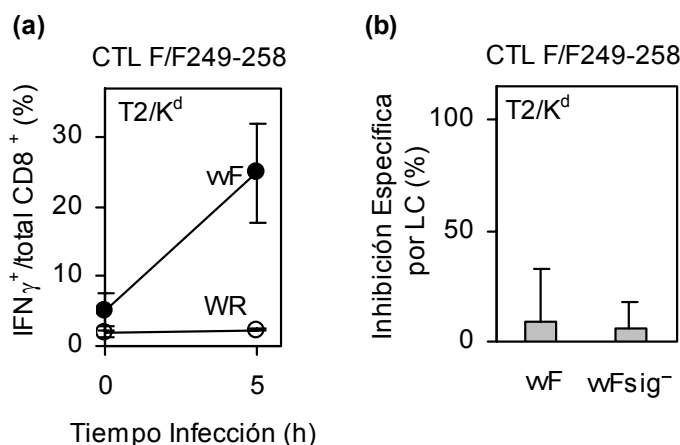


Figura 36. La presentación exógena independiente de TAP del epítipo F249-258 requiere el transcurso de la infección y no es mediada por el proteasoma. Se realizaron ensayos de ICS con CTL F/F249-258 y células T2/K^d. **(a)** Se infectaron células con vvF o la cepa parental WR durante 5 h (tras adsorción a 37°C durante 1 h) ó 0 h (sólo adsorción a 4°C durante 1 h). Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido. Se representa la media de los datos de dos experimentos independientes en los que la inhibición media específica por BFA de la presentación fue del 70%. **(b)** Se infectaron células en presencia de LC con los virus indicados. Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido en presencia o no de LC. Se representa la media de datos correspondientes a dos experimentos independientes.

Finalmente, también consideramos que la furina podría estar implicada en el procesamiento exógeno independiente de TAP del epítipo F249-258, ya que esta enzima reside principalmente en TGN, y también recircula a la membrana plasmática y a endosomas (Thomas 2002). De hecho se ha demostrado la producción de ligandos de MHC de clase I como resultado del procesamiento por furina tanto de proteínas antigénicas de origen endógeno (Gil-Torregrosa y col. 1998; Gil-Torregrosa y col. 2000), como de oligopéptidos antigénicos adicionados exógenamente (Lu y col. 2001; Lu y col. 2004). Así pues se realizaron ensayos de ICS con CTL F/F249-258 y dianas T2/K^d infectadas con los rVV que codifican la proteína F secretada sin uno o sin ambos sitios de furina. La **Figura 37** muestra que no hubo efecto negativo sobre la activación de CTL al eliminar uno o ambos sitios de corte por furina, por el contrario detectamos más bien una cierta potenciación al eliminar el sitio II. La presentación fue resistente a BFA (datos no mostrados). A diferencia de lo observado con CTL F/F85-93 (**Fig. 34a**), la activación de CTL F/F249-258 por células infectadas con vvFtm⁻ fue inferior a la activación observada al infectar con vvF. Por lo tanto la región transmembrana sería favorable para la presentación independiente de TAP del epítipo F249-258, por razones desconocidas. Por otra parte, en ausencia de región

transmembrana, al interferir en la maduración de la proteína F, la activación de CTL F/F249-258 fue superior, de modo que la conformación de la proteína F0 antes de madurar por la acción de proteasas tipo furina también sería favorable para el procesamiento del epítipo F249-258. Por razones técnicas, no se pudieron realizar ensayos con el inhibidor de furina decRVKR-cmk. No obstante, los resultados descartan un papel de la furina en la vía exógena de procesamiento independiente de TAP del epítipo F249-258 que tiene lugar en células infectadas con rVV.

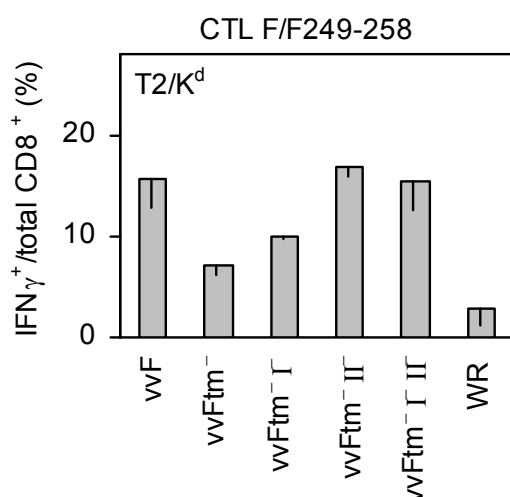


Figura 37. La presentación exógena independiente de TAP del epítipo F249-258 no es mediada por furina. Se realizaron ensayos de ICS con CTL F/F249-258 y células T2/K^d infectadas con los virus indicados. Se representa la media de dos experimentos independientes en los que la infección se realizó durante 4 ó 15 horas. Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido. En uno de los experimentos además se realizó la infección con los diferentes virus en presencia de BFA, el promedio de la inhibición por BFA para los virus vvFtm⁻I⁻, vvFtm⁻II⁻, y vvFtm⁻I⁻II⁻ fue del 15%.

4.3.6. Procesamiento y presentación de los epítopos F85-93 y F249-258 en células infectadas con VRS.

VRS es limitado para el estudio del procesamiento antigénico *in vitro* ya que requiere largos tiempos de infección que no permiten realizar infecciones en presencia de algunos inhibidores del procesamiento antigénico. Además, el hecho de que un VRS recombinante que carezca de la proteína F sea inviable no permite controlar adecuadamente la activación inespecífica y los posibles efectos de los inhibidores en la infección viral. No obstante quisimos estudiar hasta donde fuese posible el procesamiento y presentación de los epítopos F85-93 y F249-258 en el contexto viral natural del antígeno. Para ello, células T2/K^d infectadas a diferentes m.o.i. con VRS durante 16 ó 40 h se utilizaron en ensayos de ICS con las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258. Para controlar la activación inespecífica se realizó una infección a tiempo 0 h con VRS, además de una infección simulada con medio. Se observó activación de CTL F/F249-258 por células T2/K^d deficientes en TAP infectadas con VRS (**Fig. 38**, panel superior derecho). La activación de CTL F/F249-258 se detectó cuando la infección se realizó en las condiciones de m.o.i. y tiempo de infección mayores posibles. Por lo tanto, concluimos que el epítipo F249-258 se presenta independientemente de TAP cuando la proteína F está en su contexto viral natural.

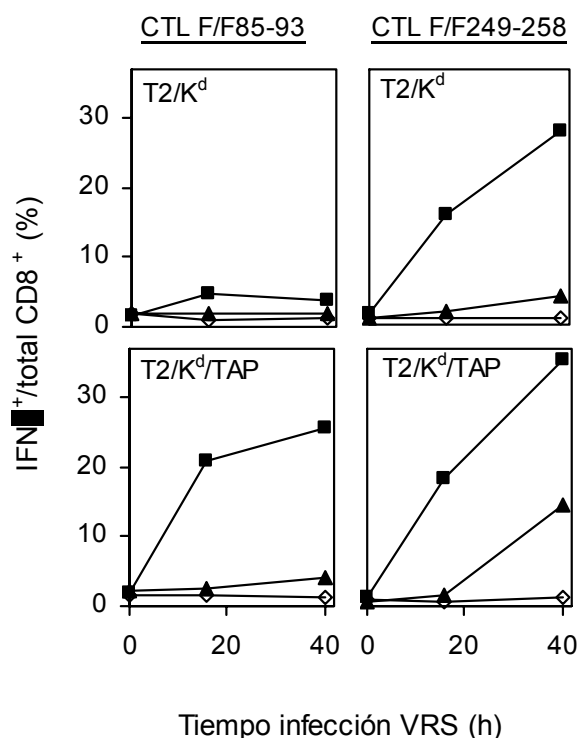


Figura 38. En células infectadas con VRS sólo hay presentación independiente de TAP del epítipo F249-258, mientras que ambos epítopos se presentan en presencia de TAP. Ensayo de ICS realizado activando las líneas CTL F/F85-93 (paneles a la izquierda) o CTL F/F249-258 (paneles a la derecha) con células T2/K^d (paneles superiores) o T2/K^d/TAP (paneles inferiores) infectadas con VRS Long. La infección se realizó durante distintos tiempos a una m.o.i. de 3 (■) o 0,3 (▲). Como control negativo se realizó una infección simulada con medio (◇). Se representa el porcentaje del total de linfocitos CD8⁺ que fueron positivos para IFN γ a cada tiempo de infección.

Por el contrario, nuestros resultados sugieren que el epítipo F85-93 no se presenta independientemente de TAP en células infectadas con VRS, ya que la activación de la línea CTL F/F85-93 no fue superior a la activación inespecífica (**Fig. 38**, panel superior izquierdo), a diferencia de lo observado anteriormente con células infectadas con vvF (**Fig. 28**). Así al introducir la proteína F en un contexto viral diferente, el del virus vaccinia, hay una nueva vía de procesamiento independiente de TAP disponible para la presentación del epítipo F85-93 (descrita en los apartados 4.3.2. y 4.3.4.), que no detectamos en el contexto viral de VRS.

Con el fin de estudiar el procesamiento en presencia de TAP, se infectaron con VRS células T2/K^d/TAP y se realizaron ensayos de ICS con las líneas CTL F/F85-93 y CTL F/F249-258 (**Fig. 38** paneles inferiores). La activación de la línea CTL F/F249-258 fue superior a la observada en células T2/K^d, lo que parece sugerir pero no demostrar que podría existir una vía dependiente de TAP de presentación del epítipo F249-258. Se observó además activación de la línea CTL F/F85-93, indicando que el epítipo F85-93 se presenta por una vía dependiente de TAP cuando la proteína F está en su contexto viral natural. De nuevo, la activación de CTL se detectó cuando la infección se realizó en las condiciones de m.o.i. y tiempo de infección mayores posibles. Por lo tanto concluimos que cuando los epítopos son procesados a partir de la proteína F en su contexto viral natural la presentación es dependiente de TAP para F85-93, y fundamentalmente independiente de TAP para F249-258.

Dentro de las limitaciones de VRS, quisimos estudiar la naturaleza endógena o exógena de la presentación de los epítomos F85-93 y F249-258 cuando la proteína F está en su contexto viral natural. Al infectar células T2/K^d/TAP y T2/K^d con VRS en presencia de BFA se observaron porcentajes elevados de inhibición específica (**Fig. 39**). Las infecciones se realizaron durante el tiempo de infección mayor en el que la BFA no resulta tóxica para las células, y se controló la presentación de concentraciones bajas de péptido sintético en presencia de BFA (datos no mostrados). Por consiguiente concluimos que cuando ambos epítomos son procesados a partir de la proteína F en su contexto viral natural la presentación es endógena.

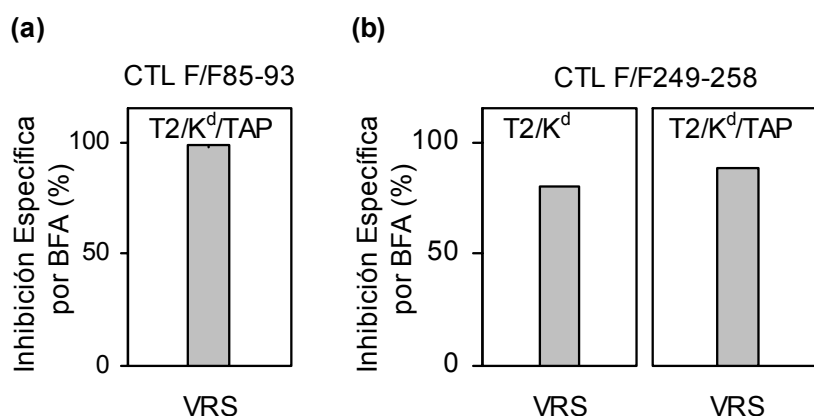


Figura 39. La presentación de los epítomos F85-93 y F249-258 en células infectadas con VRS es siempre endógena. Ensayos de ICS realizados con las líneas CTL F/F85-93 (a) y CTL F/F249-258 (b), y células T2/K^d/TAP o T2/K^d infectadas con VRS a una m.o.i. de 3 durante 15 h en presencia o ausencia de BFA. Se controló la activación de CTL por concentraciones bajas de péptido en presencia o no de BFA. Se indica el porcentaje de inhibición específica relativo a las mismas células infectadas en ausencia de BFA. Se representan datos de uno a tres experimentos independientes.

5. Discusión

5.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CTL ESPECÍFICAS DE LA PROTEÍNA F DE VRS LONG E IDENTIFICACIÓN DE LOS EPÍTOPOS RECONOCIDOS.

Para llevar a cabo este trabajo se han generado con éxito diferentes líneas de CTL policlonales específicas de la proteína F de la cepa Long de VRS. Se han utilizado dos aproximaciones, generar líneas multiespecíficas empleando células infectadas con VRS como estimuladoras, o generar líneas monoespecíficas estimulando con péptido sintético. En el primer caso se utilizaron de forma novedosa las células BCH4 persistentemente infectadas con la cepa Long de VRS, siendo relativamente sencilla la puesta a punto de las condiciones de estimulación.

En la cepa A2 de VRS se habían descrito previamente dos epítomos presentados por K^d y reconocidos por CTL murinos, F85-93 (Chang y col. 2001) y F92-106 (Jiang y col. 2002), y en este trabajo se demuestra que F85-93 (KYKNAVTEL) se conserva como epítomo en la cepa Long, tal y como se espera por la secuencia conservada en el epítomo y sus regiones flanqueantes. Sin embargo, no tenemos ninguna evidencia de la presencia del epítomo F92-106. A pesar de un 98% de identidad entre las proteínas F de las cepas A2 y Long de VRS (López y col. 1988), los residuos 11 y 12 del péptido F92-106 de 15 aa no se conservan (PT en A2 y AA en Long), y puede que sean críticos para la unión no canónica del epítomo a K^d. CTL generados a partir de ratones BALB/c inmunizados con el péptido F92-106 correspondiente a la cepa A2, son capaces de reconocer células BCH4 persistentemente infectadas con la cepa Long de VRS (Jiang y col. 2002), y sin embargo nuestros resultados indican que no se generan CTL F/F92-106 en ratones BALB/c infectados con el rVV vvF que codifica la proteína F de la cepa Long. Es posible que exista una reacción cruzada de CTL específicos del epítomo F92-106 de A2 con las células BCH4 que presentan el péptido de Long. Otra posibilidad es que exista una limitación en el repertorio de CTL con un TCR complementario al péptido de Long y no al de A2. No obstante, puesto que se trata de un péptido inusualmente largo y se desconoce su modo de unión a K^d, lo más probable es que el péptido F92-106 no sea un buen reactivo para mimetizar este epítomo potencial en la cepa Long.

Utilizando programas de predicción de epítomos y el virus vvF-ΔF2 que codifica una forma mutante de la proteína F que carece de la subunidad F2, hemos identificado un epítomo de CTL que denominamos F249-258. Este epítomo es presentado por K^d como un nonámero (F249-257: TYMLTNSEL) o un decámero (F249-258: TYMLTNSELL), y está localizado cerca del sitio antigénico II para anticuerpos neutralizantes (López y col. 1998). Mediante reestimulación *in vitro*, hemos podido determinar la presencia de linfocitos T CD8⁺ específicos de F249-258 en ratones BALB/c infectados tanto con vvF como con el virus natural VRS. Se ha generado una línea CTL ΔF2/BCH4 que carece de clones específicos de

F85-93, en la que el nonámero F249-257 activó a la mitad de células CD8⁺ de la línea, mientras que el decámero F249-258 activó a casi todas las células CD8⁺ de la línea, sugiriendo que esta línea no reconoce otros epítomos. Sin embargo, en el caso de la línea CTL F/BCH4, que reconoce mayormente al epítomo F85-93, se observó la misma activación con el nonámero F249-257 y el decámero F249-258. Estas observaciones se explicarían si la mitad de los clones seleccionados en la línea CTL Δ F2/BCH4 tuviesen menor afinidad por el epítomo, por lo cual no reconocerían el nonámero. Los clones de mayor afinidad que reconocerían tanto el nonámero como el decámero, completarían la otra mitad de CTL presentes en la línea CTL Δ F2/BCH4, y serían los únicos existentes en menor número en la línea CTL F/BCH4. Estos resultados sugieren que el decámero F249-258 es probablemente un ligando natural de K^d, al menos en las células BCH4 utilizadas en la estimulación de líneas de CTL. No obstante, aunque son muchos los trabajos publicados en los que la identidad del péptido natural se infiere de péptidos sintéticos, la identificación correcta del péptido natural se debe realizar por extracción y purificación bioquímicas seguidas de espectrometría de masas, tanto en el caso de F249-258 como de F85-93. El péptido natural podría tener extensiones respecto al péptido sintético o estar modificado. De hecho un estudio reciente indica que si bien la mayoría de péptidos endógenos presentados por K^d son nonámeros, también existe un porcentaje considerable de péptidos más largos, con extensiones generalmente en el extremo carboxilo (Suri y col. 2006).

El epítomo F249-258 probablemente también existe en la proteína F de la cepa A2, ya que su secuencia y también la de las regiones flanqueantes, que pueden influenciar la eficiencia de presentación y procesamiento de antígeno (Del Val y col. 1991), se conservan en al menos 35 aa a cada lado. Sin embargo, el epítomo F249-258 no fue identificado en estudios previos (Chang y col. 2001; Jiang y col. 2002), cuya estrategia se basó en el empleo de péptidos solapantes que cubren la secuencia de la proteína F. El panel de péptidos de 15 aa solapantes en 5 aa utilizado en la identificación del epítomo no canónico F92-106 en la cepa A2, no incluía ningún péptido en el que el epítomo F249-258 estuviera completo (Jiang y col. 2002), lo cual explica que no se detectara. No obstante, tampoco se identificó el epítomo F85-93 a pesar de haber incluido el péptido QELDKYKNAVTELQLL con el epítomo completo, si bien se utilizaron linfocitos de pulmón de ratones infectados con VRS 7 días antes. No disponemos de la información de los péptidos empleados en el otro estudio (Chang y col. 2001).

Nuestros resultados demuestran que los programas de predicción de epítomos, aunque incapaces de predecir epítomos no canónicos, pueden ser herramientas poderosas en la identificación de epítomos de CTL, tal y como se ha discutido (Nussbaum y col. 2003). Decidimos sintetizar determinados péptidos correspondientes a epítomos putativos presentados por K^d en base a dos programas de predicción de epítomos basados en motivos

consenso de unión a MHC de clase I, y a un programa de predicción de extremos carboxilo probables en ligandos de MHC de clase I. Se ha demostrado que la predicción de epítomos de MHC de clase I basándose en motivos consenso no mejora cuando se combina también con programas de predicción de cortes carboxilo generados por el proteasoma, y sí cuando se considera la eficiencia de transporte por TAP como parámetro adicional (Peters y col. 2003). No empleamos este último algoritmo ya que su desarrollo fue posterior a la identificación del nuevo epítomo F249-258.

5.2. MÚLTIPLES VÍAS DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE EPÍTOMOS DE LA PROTEÍNA F.

En general, un antígeno presentado a CTL en células infectadas con cualquier virus también es presentado a CTL cuando se expresa en rVV. Hay sin embargo muy poca información sobre la conservación de las vías de procesamiento de estos antígenos entre su contexto viral natural y el de la infección con rVV. Hemos estudiado en diferentes contextos virales el procesamiento y presentación de los epítomos F85-93 y F249-258, y nuestros resultados indican que existen diferentes vías de presentación dependiendo del epítomo y del contexto viral del antígeno (resumidas en la **Tabla V**). El epítomo F85-93 se presenta por una vía endógena (BFA^S) dependiente de TAP cuando la proteína F está en ambos contextos virales, VRS y rVV. Además, en células infectadas con vvF funciona una vía de presentación endógena independiente de TAP para el epítomo F85-93. El epítomo F249-258 se presenta por una vía de presentación independiente de TAP que es endógena (BFA^S) o mayormente exógena (BFA^R), en función del contexto viral, VRS o rVV, respectivamente. De este modo, diferentes vías de procesamiento permiten que ambos epítomos sean presentados a CTL tanto en células infectadas con VRS como con rVV.

La presentación independiente de TAP de epítomos de CTL de VRS no había sido demostrada antes, si bien se ha documentado la presentación independiente de TAP de proteínas de virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae* a la que pertenece VRS. Es el caso de la presentación independiente de TAP de la nucleoproteína NP del virus Sendai (Zhou y col. 1993), de la proteína F del virus del sarampión (Grommé y col. 1999), y de las proteínas N de la nucleocápsida de los virus del sarampión y del moquillo (Neumeister y col. 2001). Existe pues la posibilidad de que los paramixovirus faciliten el acceso a vías de procesamiento de antígeno para su presentación por MHC de clase I independientes de TAP.

Nuestros resultados indican que el contexto viral de vaccinia permite la presentación independiente de TAP de epítomos de la proteína F de VRS. Sin embargo, no se observa

presentación independiente de TAP de las proteínas N de paramixovirus cuando se expresan a partir de rVV (Neumeister y col. 2001). *In vivo* también se han documentado diferencias dependiendo del contexto viral en la capacidad de inducir CTL a través de vías independientes de TAP. Así es posible inducir CTL específicos de un epítipo del virus herpes simplex en ratones deficientes en TAP inmunizados con ADN o infectados con rVV, pero no cuando se infectan con el virus natural (Paliard y col. 2001). Si bien es muy infrecuente observar diferencias en la presentación de un antígeno al cambiar su contexto viral a rVV, no se puede asumir, sin comprobarlo, que se mantienen las vías de procesamiento del antígeno en su contexto natural.

Tabla V. Compilación de las vías de presentación por K^d de los epítipos F85-93 y F249-258 descritas en este trabajo. Se indican las vías dependientes e independientes de TAP descritas para los epítipos F85-93 y F249-258 atendiendo al contexto viral (rVV o VRS) y a la forma de proteína F (nativa o citosólica). Se indica en cada caso si la presentación fue endógena o exógena, en función de la sensibilidad o resistencia al metabolito BFA que bloquea el transporte de salida, y no de entrada, en la vía secretoria constitutiva. En los casos en los que se pudieron realizar ensayos con el inhibidor de proteasoma LC o el inhibidor de aminopeptidasas LeuSH se indica la sensibilidad o resistencia al inhibidor.

Contexto viral	Proteína F	Presentación dependiente de TAP		Presentación independiente de TAP	
		F85-93 ^a	F249-258	F85-93 ^a	F249-258
VRS	F nativa	+ endógena (BFA ^S)	^b	-	+ endógena (BFA ^S)
rVV	F nativa	+ endógena (BFA ^S) proteasoma (LC ^S)	^b	+ endógena (BFA ^S) potenciable LeuSH LC ^R	+ ^c exógena (BFA ^R) LC ^R
rVV	F citosólica ^a (Fsig ⁻)	+ endógena (BFA ^S) proteasoma (LC ^S)	^b	-	+ ^c exógena (BFA ^R) LC ^R

^aEn cuanto a la presentación del epítipo F85-93, la proteína FS2 codificada en el rVV VAFS2 se comporta igual que la proteína F citosólica (ver **Fig. 33**).

^bLos datos de las **Figuras 30b** y **38** podrían sugerir una vía minoritaria de presentación endógena dependiente de TAP del epítipo F249-258 en células infectadas con ambos virus, pero los datos no son concluyentes.

^cEn células infectadas con rVV no se observó una resistencia total a BFA por lo que no se descarta una vía de presentación endógena (ver **Fig. 29**).

En células infectadas con VRS, sólo hay presentación independiente de TAP del epítipo F249-258 (**Tabla V**). Cuando la proteína F está codificada en rVV, ambos epítipos F85-93 y F249-258 son presentados por vías de procesamiento independientes de TAP, pero las vías son muy diferentes entre sí (**Tabla V**). La presentación independiente de TAP del epítipo F85-93 es endógena (BFA^S) y el epítipo no se procesa a partir de una forma citosólica de la proteína F. Por el contrario, la presentación independiente de TAP del epítipo

F249-258 es exógena (BFA^R), y el epítipo se procesa a partir de la forma citosólica de la proteína F (**Tabla V**). Por lo tanto, diferentes vías de presentación independientes de TAP son accesibles a epítipos presentados por la misma molécula de MHC de clase I y procesados a partir de la misma proteína codificada en rVV. La proteína F se comporta de forma similar a la proteína Jaw1 residente en el RE, que cuando está codificada en rVV permite la presentación independiente de TAP del epítipo de gripe NP₁₄₇₋₁₅₅ presentado por K^d mediante tres mecanismos diferentes. Atendiendo al sitio de inserción del epítipo y la utilización de Jaw1 nativa o mutada, la presentación independiente de TAP requiere la acción de la peptidasa señal, de otra endoproteasa de la vía secretoria, o de proteasas citosólicas no identificadas (Snyder y col. 1997; Snyder y col. 1998).

En cuanto a la presentación dependiente de TAP, ambos epítipos son también muy diferentes, pues sólo podemos detectar inequívocamente esta vía para el epítipo F85-93 en ambos contextos virales (**Tabla V**).

El conjunto de los resultados obtenidos en relación al procesamiento de los epítipos F85-93 y F249-258 en células deficientes o no en TAP, se resume en el modelo de la **Figura 40** propuesto para las vías descritas tanto en células infectadas con rVV (panel superior) como con VRS (panel inferior). En algunas de estas vías de procesamiento proponemos un mecanismo hipotético que es compatible con nuestros resultados, si bien hay otras hipótesis que también podrían serlo.

5.2.1. Vías de procesamiento del epítipo F85-93.

En células infectadas con vvF, el epítipo F85-93 se puede presentar por vías dependientes o independientes de TAP, al igual que se ha documentado en el caso de la presentación de algunos epítipos de la proteína env de la envuelta de VIH en células infectadas con rVV que codifican dicha proteína (Hammond y col. 1995).

El epítipo F85-93 es procesado por una vía endógena dependiente de TAP cuando la proteína F está en su contexto natural o en rVV (**Fig. 40**). Además esta vía de procesamiento es accesible a las formas citosólica (Fsig⁻) o retenida antes del compartimento intermedio del Golgi (FS2) de la proteína F codificadas en rVV. Las distintas formas de proteína F codificada en rVV son procesadas por el proteasoma generándose el epítipo F85-93, aunque desconocemos si el proteasoma genera un precursor o el epítipo final. Es probable que la proteína F en el contexto de VRS también sea procesada por el proteasoma, sin embargo este análisis no se pudo realizar por dificultades técnicas.

Además, la expresión de la proteína F a partir de un rVV permite el procesamiento del epítipo F85-93 por una vía endógena (BFA^S) e independiente de TAP, que no es accesible a las proteínas Fsig⁻ o FS2 codificadas en rVV, o a la proteína F en su contexto viral natural.

Así pues, el contexto viral de la proteína F parece ser crítico para la vía de presentación independiente de TAP de F85-93. La línea linfoblastoide T2 es un híbrido de una línea T humana y de una variante de una línea B humana seleccionada por la pérdida de expresión de MHC de clase II e inducida por radiación (Salter y col. 1985). La presentación endógena de epítomos de la proteína F demuestra que VRS infecta células T2/K^d, lo cual es esperable ya que VRS es capaz de infectar *in vitro* linfocitos B humanos (Bangham y McMichael 1986). Sin embargo, la infección de las células T2/K^d con VRS es débil (M. A. Rico-Daza, comunicación personal). Aunque no podemos descartar efectos de la distinta biología de las dos infecciones virales, es posible que cuando la proteína F está en el contexto viral de VRS, con menos capacidad que rVV de infectar las células T2/K^d o T2/K^d/TAP, sólo se observe presentación de F85-93 por la vía en la que la carga de moléculas K^d con F85-93 es más eficaz, que en este caso postulamos que sería la vía dependiente de TAP.

Hemos comprobado que la presentación endógena (BFA^S) e independiente de TAP de F85-93 no se debe a fugas de productos proteasomales del citosol al RE. La peptidasa señal es una de las únicas dos proteasas identificadas en vías independientes de TAP, y está implicada en la presentación de epítomos adyacentes o muy cercanos a su punto de corte. Sin embargo, la secuencia señal de la proteína F corresponde a los residuos 1-21, por lo que descartamos un papel de la peptidasa señal en el procesamiento independiente de TAP de F85-93.

La segunda proteasa identificada en una vía de procesamiento endógeno e independiente de TAP es la furina residente en TGN, y está implicada en la generación de diversos epítomos presentados por todas las moléculas de MHC de clase I testadas (Gil-Torregrosa y col. 1998; Gil-Torregrosa y col. 2000; P. de León y F. Medina comunicación personal), incluyendo K^d. La vía de la furina podría ser accesible a otras proteínas procesadas por furina como la proteína F de VRS. Así pues hemos estudiado en profundidad la participación de furina en el procesamiento endógeno e independiente de TAP del epítomo F85-93, situado relativamente próximo al sitio I de corte en la posición 109. Nuestros resultados descartan un papel de la furina ya que la infección en presencia de un inhibidor de furina, o la infección con rVV que codifican formas de la proteína F secretada sin uno o ambos sitios de furina, permiten la presentación independiente de TAP de F85-93. La presentación endógena por la vía mediada por furina se ha descrito con una proteína quimérica en la que los péptidos con epítomos virales son liberados por la furina durante la maduración, introduciendo siempre los epítomos en una porción de la proteína que no forma parte de la proteína madura y por tanto tiende a degradarse (Gil-Torregrosa y col. 1998; Gil-Torregrosa y col. 2000). El hecho de que el epítomo F85-93 esté situado en la proteína madura podría limitar el acceso de proteasas posteriores de recorte a la subunidad F2 producto de la furina. Además, el corte por furina tiene lugar en un residuo algo más alejado

del epítipo que en el resto de los casos estudiados, lo que podría dificultar la tarea de enzimas como amino o carboxipeptidasas que contribuirían a dar el tamaño correcto del péptido final, y hacer inviable, por ineficaz, esta vía.

El inhibidor de aminopeptidasas LeuSH potencia la presentación independiente de TAP del epítipo F85-93. Dado que la aminopeptidasa de RE asociada al procesamiento de antígeno ERAAP/ERAP produce el recorte final de precursores de péptidos, es frecuente que su inhibición impida la presentación antigénica. Sin embargo, estudios previos han documentado también la potenciación de la presentación de ciertos péptidos antigénicos en células tratadas con LeuSH (Serwold y col. 2001) o con un ARN de interferencia específico de ERAAP (Serwold y col. 2002). No sabemos si aminopeptidasas LeuSH^S participan directamente en el procesamiento de F85-93, o si la potenciación observada es un efecto indirecto por la presencia de menos péptidos que compiten con F85-93 por su unión a K^d. No obstante, teniendo en cuenta que las aminopeptidasas de RE son más sensibles a LeuSH que las aminopeptidasas citosólicas (Serwold y col. 2001), consideramos más probable la hipótesis propuesta en la **Figura 40** en la que residuos críticos para la unión a K^d del péptido F85-93 serían recortados y destruidos por ERAP, probablemente por ERAP2 debido a su preferencia de recorte de residuos básicos en el extremo amino. Esta destrucción por ERAP también podría operar en el procesamiento de F85-93 por la vía dependiente de TAP.

La presentación independiente de TAP de F85-93 probablemente requiere la acción de endoproteasas, distintas a la peptidasa señal y a furina, que podrían generar el epítipo en compartimentos BFA^S o BFA^R, ya que en cualquier caso la vía sería BFA^S por la dependencia del acceso de la proteína F. Por simplificar, en la **Figura 40** sugerimos la participación de una endoproteasa que actuaría sobre F0 generando el epítipo final, que sería cargado en un complejo estable con K^d y β_2m en el RE.

5.2.2. Vías de procesamiento del epítipo F249-258.

El epítipo F249-258 se presenta por vías independientes de TAP distintas según el contexto viral de la proteína F. En células infectadas con VRS la presentación es endógena (BFA^S), mientras que tras la infección con rVV que codifican la proteína F o su forma citosólica Fsig⁻ la presentación es mayormente exógena (BFA^R) (**Tabla V**). Es evidente que la existencia de una vía BFA^R complica enormemente la interpretación de los resultados ya que podría enmascarar una vía BFA^S. Por otra parte, no existen datos que apoyen firmemente la existencia de una posible vía de presentación de F249-258 endógena y dependiente de TAP (**Tabla V**, nota b), ni la participación del proteasoma en ella.

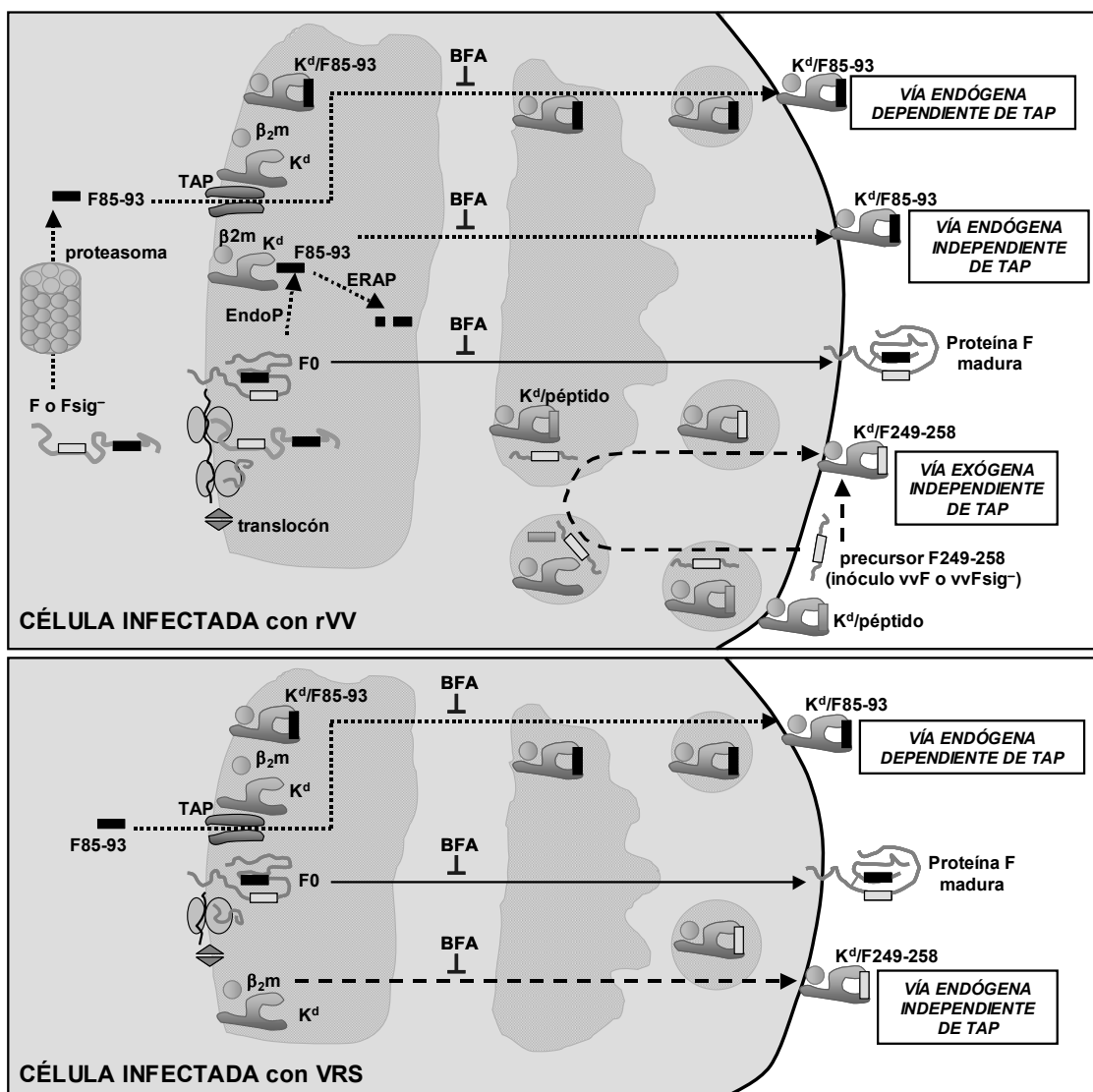


Figura 40. Modelo para el procesamiento de los epítomos F85-93 y F249-258 para su presentación por K^d en células infectadas con rVV (panel superior) o VRS (panel inferior). La proteína F expresada en cualquiera de los contextos virales se sintetiza como precursor F0, insertándose cotraduccionalmente en el RE a través del translocón gracias a su secuencia señal. La proteína F madura por furina en el TGN y se exporta a la membrana plasmática por la vía secretoria constitutiva BFA^S. Por simplificar, se representan agrupados los compartimentos BFA^S (RE y compartimentos proximales del Golgi) y BFA^R (compartimentos distales del Golgi y TGN), indicando el punto de bloqueo entre ellos. La línea punteada indica las vías de procesamiento dependientes e independientes de TAP de **F85-93**. En células infectadas con rVV (panel superior), F85-93 se presenta por dos vías endógenas, una dependiente y otra independiente de TAP. En la vía clásica dependiente de TAP, el proteasoma degradaría en el citosol sustratos ubiquitinados provenientes de moléculas retrotranslocadas de la proteína F, y de su forma citosólica Fsig⁻ (la proteína FS2 no representada se comportaría como Fsig⁻). Se produciría el epítipo o un precursor que sería translocado por TAP al RE para su carga en un complejo estable con K^d y β_2m . En la vía independiente de TAP, F85-93 se generaría en algún compartimento de la vía secretoria por la acción de una endoproteasa desconocida quizás sobre F0, y podría ser destruido por ERAP. En células infectadas con VRS (panel inferior) sólo se observa una vía endógena dependiente de TAP. La línea discontinua indica las vías endógena y exógena de procesamiento independientes de TAP de **F249-258**. En células infectadas con rVV (panel superior), precursores de F249-258 presentes en el inóculo viral de vvF o vvFsig⁻ serían responsables de la presentación de F249-258 por una vía exógena (BFA^R), que podría requerir o no la internalización de los precursores para su procesamiento. La carga de F249-258 podría ocurrir por intercambio de péptido en complejos K^d ya cargados en la vía secretoria o en la membrana plasmática, o en complejos K^d en reciclaje en la vía endocítica. En células infectadas con VRS el epítipo F249-258 se presenta por una vía endógena independiente de TAP.

Hemos estudiado la posible participación de furina en la presentación exógena independiente de TAP de F249-258 ya que la furina reside en TGN, un compartimento BFA^R. Sin embargo, descartamos un papel directo de furina, ya que los rVV que codifican formas de la proteína F secretada sin uno o ambos sitios de corte por furina permiten la presentación de F249-258 en ausencia de TAP.

Una primera hipótesis, representada en la **Figura 40**, para explicar la particularidad de que rVV, y no VRS, permita la presentación de F249-258 por una vía BFA^R implicaría que la presentación exógena observada no se deba a precursores de F249-258 sintetizados endógenamente sino ya presentes en el inóculo viral. En este caso, a pesar de estar parcialmente purificado, existiría epítipo F249-258 o un precursor en el inóculo de rVV, durante cuya morfogénesis la partícula viral incorpora envueltas membranosas provenientes de la vía secretoria. Sin embargo, el hecho de que la presentación independiente de TAP exógena de F249-258 requiera el transcurso de la infección con rVV, nos permite descartar la presencia del péptido exacto en el inóculo viral. En esta hipótesis, el transcurso de la infección sería por lo tanto necesario para introducir y/o procesar precursores de F249-258. Los precursores de F249-258 presentes en el inóculo viral podrían acceder a los compartimentos BFA^R directamente desde la vía endocítica tras la internalización del rVV. Otra posibilidad es que los precursores de F249-258 presentes en el inóculo de rVV se procesen en la membrana plasmática o extracelularmente, ya que por ejemplo se ha descrito el procesamiento de otros antígenos por proteasas del suero (Falo y col. 1992). En cualquier caso, F249-258 sería cargado por intercambio de péptido en moléculas K^d ya cargadas en la vía secretoria o en la membrana plasmática, o en moléculas K^d cargadas o no en reciclaje por la vía endocítica. Si existen precursores de F249-258 en el inóculo viral, han de ser péptidos muy estables ya que no se degradarían durante los procesos de producción, purificación, y almacenaje del inóculo viral. El empleo de virus inactivado podría aclarar esta hipótesis, si bien el método utilizado para inactivar el virus podría ser crítico para la presentación posterior de los posibles péptidos precursores de F249-258, tal y como se ha demostrado para otros virus (Yewdell y col. 1988). Por otra parte, postulamos que los precursores de F249-258 no se incorporarían en el inóculo de VRS, cuya morfogénesis ocurre en la membrana plasmática a donde llegan las glicoproteínas virales a través de la vía secretoria.

El hecho de que la proteína F citosólica sea muy poco abundante y no se asocie a membranas como la proteína F nativa, hace cuestionable la presencia de tantos precursores de F249-258 en el inóculo de vvFsig⁻ como en el inóculo de vvF. De hecho, el que F249-258 se presente por una vía BFA^R a partir de la forma citosólica de la proteína F nos ha llevado a controlar exhaustivamente la ausencia de fugas de péptidos citosólicos hacia el RE en las células T2/K^d. El epítipo NP₁₄₇₋₁₅₅ presentado por K^d codificado en rVV como una

miniproteína citosólica no es presentado, y sí su versión con secuencia señal. Más aún, el epítipo F85-93 codificado en la misma proteína que F249-258 también nos ha permitido controlar la ausencia de fugas en las células T2/K^d: hemos visto que la proteína F citosólica no permite la presentación de F85-93, y que no hay fugas de F85-93 o sus precursores producidos en el citosol por el proteasoma hacia el RE. Por estas observaciones, una hipótesis alternativa a la presencia de precursores de F249-258 en el inóculo viral y que se ajusta a los resultados obtenidos con la forma citosólica de la proteína F, implicaría que precursores de F249-258 accedan desde el citosol a compartimentos BFA^R. Estos precursores de F249-258 serían generados, a partir de la proteína F nativa y citosólica codificadas en rVV, por proteasas citosólicas, aunque no por el proteasoma, según indican los resultados con LC.

Siguiendo con esta segunda hipótesis, diferentes estudios que utilizan células T2 para investigar la presentación por mecanismos independientes de TAP de epítopos codificados en plásmidos o virus como rVV (resumidos en la **Tabla I** en el apartado de Introducción, página 12), proponen la existencia de mecanismos de translocación de péptidos citosólicos alternativos a TAP (Zweerink y col. 1993; Hammond y col. 1995; Snyder y col. 1997; Lautscham y col. 2001). Se ha documentado también la translocación de péptidos antigénicos en vesículas microsomales obtenidas de células T2, es decir, en ausencia de TAP (Lévy y col. 1991). Además, el estudio de los péptidos naturales unidos a K^d en células con y sin TAP revela que en ausencia de TAP los péptidos unidos por K^d son más largos, y se ha sugerido que péptidos citosólicos podrían acceder independientemente de TAP a la vía de presentación por MHC de clase I, quizás por autofagia (Suri y col. 2006). Por otra parte, se ha documentado la presentación de antígenos endógenos citosólicos por moléculas de MHC de clase II (Jaraquemada y col. 1990), que en general presentan péptidos largos procesados en compartimentos endosomales a partir de antígenos exógenos. Por último, en las células T2 se ha demostrado la presencia de moléculas de MHC de clase I en compartimentos de MHC de clase II (Grommé y col. 1999). Así pues, debemos considerar la posibilidad de que los supuestos fragmentos de las proteínas F y Fsig⁻ que serían precursores de F249-258 y habrían sido generados por proteasas citosólicas sean translocados desde el citosol a compartimentos distales de la vía secretoria por un mecanismo de transporte alternativo a TAP e independiente de secuencia señal. Una posible explicación al hecho de que el acceso de los precursores citosólicos de F249-258 a compartimentos BFA^R sólo se detectase en células infectadas con rVV, y no con VRS, es la diferente biología de la infección de cada virus, ya que por ejemplo rVV interacciona marcadamente con el sistema membranoso intracelular.

En cualquiera de las dos hipótesis propuestas para la presentación exógena independiente de TAP de F249-258, es posible que intervengan características especiales de

regiones de la proteína F que sólo afecten al epítipo F249-258, y no a F85-93. Existen por ejemplo regiones hidrofóbicas próximas al epítipo F249-258 en la proteína F, siendo una de ellas la región heptádica HRA situada en los residuos 156-201 (Zhao y col. 2000). Además, se ha demostrado que un segmento de la proteína F del virus Sendai es capaz de inducir la fusión de membranas (Peisajovich y col. 2000), y corresponde a los residuos 221-242 de la proteína F de VRS (Smith y col. 2002b), muy cercanos al epítipo F249-258. Existe incluso la posibilidad de que la región transmembrana (residuos 525-550) actúe como secuencia señal (Brock y col. 2005), si bien está situada muy lejos de F249-258. Otra posibilidad es que el péptido de fusión una vez ha sido cortado, separando por tanto F249-258 de F85-93, sea lo suficientemente hidrofóbico para interaccionar de forma estable con membranas, tal y como se ha descrito para la proteína F de otro paramixovirus cuyo péptido de fusión actúa de región transmembrana, y convierte una proteína soluble en una proteína anclada a membrana (Paterson y Lamb 1987).

5.3. PATRÓN DE INMUNODOMINANCIA DE EPÍTOPOS DE LA PROTEÍNA F Y PERSPECTIVAS DE VACUNACIÓN.

5.3.1. Inmunodominancia de F85-93 sobre F249-258.

Los epítipos F85-93 y F249-258 son procesados a partir de la misma proteína y presentados por el mismo alotipo de MHC de clase I, por lo cual hemos estudiado su patrón de inmunodominancia tanto en líneas de CTL generadas *in vitro* como en la respuesta *in vivo* en ratones BALB/c infectados con VRS o con vvF. Es importante señalar que la clasificación de un determinado epítipo como inmunodominante o subdominante depende totalmente de las condiciones experimentales utilizadas, por lo que nunca se puede concluir que la incapacidad para detectar por completo una respuesta frente a un determinado epítipo implique que dicha respuesta esté totalmente ausente.

En la respuesta primaria *in vivo* a la infección con vvF se observaron frecuencias de linfocitos T CD8⁺ superiores para F85-93, pero comparables a las frecuencias de F249-258, por lo que concluimos que no existe una jerarquía significativa entre F85-93 y F249-258. Sin embargo, en las respuestas de memoria y secundaria a la infección con vvF, se produjo un aumento del número de linfocitos T CD8⁺ activados con F85-93, y una disminución en el caso de F249-258. De este modo, en ratones BALB/c durante la respuesta inmune a la infección con vvF se va estableciendo gradualmente un patrón de inmunodominancia, en el que el epítipo F85-93 se hace inmunodominante y el epítipo F249-258 se hace subdominante. La cuantificación de linfocitos T CD8⁺ específicos de cada epítipo en la línea

CTL F/BCH4 generada *in vitro*, indicó que es representativa de la respuesta secundaria a la infección con vvF *in vivo*, con una marcada inmunodominancia de F85-93 sobre F249-258.

Hay diversos factores que podrían contribuir al establecimiento de la inmunodominancia de F85-93 sobre F249-258 en la respuesta *in vivo* a vvF. Es imprescindible que el complejo K^d/péptido presentado sea capaz de desencadenar la activación y proliferación de linfocitos T CD8⁺ con un TCR complementario. En el caso del epítipo subdominante, la generación de líneas de CTL indica que en este sentido no existe una limitación *in vivo* en la disponibilidad de linfocitos T CD8⁺ capaces de reconocer el complejo K^d/F249-258.

La supresión de respuestas específicas de epítopos subdominantes por respuestas específicas de epítopos inmunodominantes se conoce como inmunodominación, y se ha documentado en respuestas a virus mediadas por linfocitos T CD8⁺. Se detecta por ejemplo observando respuestas incrementadas a epítopos subdominantes en condiciones en las que las respuestas a epítopos inmunodominantes se inhiben eliminando su molécula de MHC de clase I presentadora (van der Most y col. 1997). La inmunodominación también se observa al eliminar el epítipo inmunodominante y sus linfocitos T CD8⁺ específicos. Es el caso de lo observado al generar la línea CTL ΔF2/BCH4 a partir de ratones infectados con vvF-ΔF2 que no incluye el epítipo F85-93. Nuestros resultados *in vitro* indican que en presencia de linfocitos T CD8⁺ específicos del epítipo inmunodominante F85-93, F249-258 es subdominante, por lo que el fenómeno de inmunodominación debe considerarse como un factor que podría contribuir al patrón de inmunodominancia que se establece en la respuesta *in vivo* a la infección con vvF.

La inmunodominancia depende también de la eficiencia del procesamiento de antígeno, ya que es necesario que se presenten suficientes complejos MHC/péptido en la superficie de las células presentadoras tanto para la activación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes como de memoria. En el estudio del procesamiento antigénico de los epítopos de la proteína F hemos demostrado que el epítipo F85-93, y no el F249-258, es presentado por la vía clásica endógena dependiente de TAP mediada por el proteasoma. Esta diferencia importante en el procesamiento y presentación de los epítopos F85-93 y F249-258 también podría contribuir al patrón de inmunodominancia observado.

El patrón de inmunodominancia del epítipo F85-93 sobre F249-258 se va estableciendo gradualmente en la respuesta a la infección con vvF, y es detectable sobre todo en la respuesta secundaria. Patrones distintos de inmunodominancia en respuestas primarias y secundarias de linfocitos T CD8⁺ ya han sido descritos (Belz y col. 2000, Crowe y col. 2003). En la infección primaria con el virus de la gripe, se observan frecuencias similares de linfocitos T CD8⁺ específicos para los epítopos D^b/PA₂₂₄ y D^b/NP₃₆₆, mientras que la respuesta secundaria está dominada por linfocitos T CD8⁺ específicos de D^b/NP₃₆₆ (Belz y

col. 2000). El mecanismo subyacente a este establecimiento gradual de la inmunodominancia ha sido investigado, y se ha propuesto un modelo en el cual la diferente presentación antigénica por parte de células dendríticas y no dendríticas, unido a la capacidad de los linfocitos T CD8⁺ de percibir los antígenos presentados por estas células, regularían las cantidades de linfocitos T CD8⁺ (Crowe y col. 2003). Siguiendo con esta hipótesis, sugerimos que durante la respuesta inmune primaria a vvF en ratones BALB/c, pAPC con una proporción similar de los epítomos F85-93 y F249-258 activarían a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes, mientras que durante la respuesta inmune secundaria, los linfocitos T CD8⁺ de memoria también serían activados por células presentadoras de antígeno no profesionales con una mayor proporción del epítomo F85-93. Esto llevaría gradualmente al establecimiento de una respuesta de linfocitos T CD8⁺ fuertemente desviada hacia el epítomo F85-93 (ver **Fig. 41**).

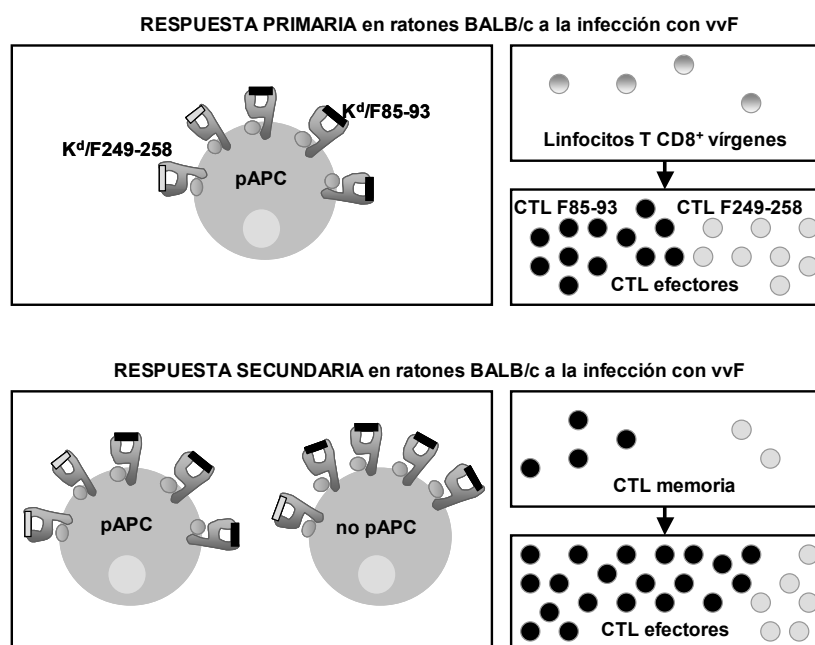


Figura 41. Modelo hipotético para el establecimiento gradual de la inmunodominancia de F85-93 sobre F249-258 en ratones BALB/c infectados con vvF. Durante la respuesta primaria las pAPC que activan linfocitos T CD8⁺ vírgenes presentarían una proporción similar de complejos K^d/F85-93 y K^d/F249-258, por lo que se activarían CTL efectores específicos de cada complejo en una proporción similar. Durante la respuesta secundaria CTL memoria serían activados por pAPC y por células no pAPC que presentarían una proporción superior del complejo K^d/F85-93, por lo que proliferarían en mayor número los CTL F85-93 que los CTL F249-258.

En la respuesta sistémica primaria *in vivo* en ratones infectados localmente con VRS, los epítomos F85-93 y F249-258 son ambos subdominantes, ya que si bien casi no se pueden detectar linfocitos T CD8⁺ por ICS *ex vivo*, sí es posible establecer líneas de CTL *in vitro* a partir de esplenocitos. El contexto viral del antígeno es pues un factor que también afecta a la inmunodominancia, entre otros aspectos por la existencia de antígenos más

dominantes. Así, se sabe que durante la respuesta primaria en pulmón a VRS las frecuencias de linfocitos T CD8⁺ específicos de F85-93 son unas diez veces inferiores a las de M2₈₂₋₉₀ (Chang y col. 2001). Suponemos que F249-258 se comportaría de forma similar a F85-93, ya que la generación de la línea CTL VRS/F249-258 indica que no es un epítipo críptico. Hemos intentado sin éxito evaluar en la respuesta primaria en pulmón a VRS, la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ específicos de F249-258 mediante la realización de lavados broncoalveolares, que permiten recuperar los linfocitos que infiltran el pulmón. Sin embargo, es posible que tengamos más éxito empleando una metodología diferente, como por ejemplo recuperar todas las células del pulmón, perfundiendo previamente, para estudiar la población de linfocitos (Chang y col. 2001).

5.3.2. Perspectivas de vacunación.

En el diseño de una vacuna eficaz frente a VRS la proteína F es el principal antígeno candidato, ya que induce anticuerpos neutralizantes de efecto profiláctico parcial y de uso actual en la clínica, así como CTL capaces de eliminar células infectadas. En el caso de VRS los primeros intentos de vacunación se llevaron a cabo sin éxito y con problemas hace 40 años. Aquellos ensayos se realizaron sin hacer pruebas previas en modelos animales, en los cuales hoy sabemos que el virus inactivado con formalina produce una enfermedad grave. Los modelos animales son pues importantes en el desarrollo de vacunas, por lo que la identificación de nuevos epítopos de CTL murinos contribuye al desarrollo de ensayos de vacunación frente a VRS en modelos murinos. En el caso de la vacunación de ratones BALB/c se sabe que una respuesta de CTL por sí sola no confiere protección frente a la infección con VRS, ya que sólo confiere protección a un desafío con VRS la vacunación con vvF o vvFtm⁻, y no con vvFsig⁻ (Bembridge y col. 1999).

Un factor crítico en la inducción de una respuesta eficaz frente a VRS mediada por CTL es dirigir la respuesta hacia varios epítopos relevantes. Las frecuencias de linfocitos T CD8⁺ cuantificadas mediante ICS en la respuesta *in vivo* a vvF fueron similares a las observadas en otros sistemas (Chen y col. 2000). Las bajas frecuencias se deben probablemente a la competición con epítopos del vector viral, lo cual se ha sugerido como responsable de la dificultad en la detección de respuestas frente al epítipo NP₁₄₇₋₁₅₅ tras la infección con un rVV codificando la nucleoproteína completa del virus de la gripe (Chen y col. 2000; Restifo y col. 1995). Esta cuestión se ha discutido en términos de las limitaciones de vectores virales que desencadenan respuestas masivas de CTL dirigidas a sus propios antígenos. Sin embargo, es destacable que en ratones BALB/c la infección *in vivo* con vvF permita obtener una notable respuesta inmune mediada por CTL hacia la proteína F, en

comparación con la respuesta a VRS, dirigida mayormente hacia el epítopo M2₈₂₋₉₀, y a pesar de la mucho menor complejidad genética y antigénica de VRS.

El hecho de que linfocitos T CD8⁺ específicos de varios epítomos de la proteína F sean generados *in vivo*, es prometedor para el potencial de generar una respuesta de linfocitos T CD8⁺ multiespecífica en la infección natural o tras la vacunación. De este modo, vacunas protectoras de la infección con VRS que incluyan varios epítomos, incluso subdominantes, permitirían incrementar el número y la variedad de linfocitos T CD8⁺ respondedores. De hecho, linfocitos T CD8⁺ específicos de epítomos virales subdominantes pueden conferir protección a la infección e incrementar la protección proporcionada por linfocitos T CD8⁺ específicos de epítomos inmunodominantes (van der Most y col. 1996; van der Most y col. 1997; van der Most y col. 1998). Por otra parte, la presencia adicional de linfocitos T CD8⁺ específicos de epítomos subdominantes podría prevenir la emergencia hipotética de mutantes virales de escape que no expresasen epítomos inmunodominantes.

Otro factor crítico en el diseño de vacunas es la capacidad de inducir un número suficiente de linfocitos T CD8⁺ de memoria para combatir la infección por el patógeno natural. La administración en distintos sitios anatómicos de varios epítomos permite evitar el fenómeno de inmunodominancia, gracias al acceso del antígeno a ganglios linfáticos distintos, aumentando el número de linfocitos T específicos de epítomos que si no serían subdominantes. Este tipo de estrategia es contraria a la actual tendencia en la administración de vacunas en el ser humano, pero se podría aplicar si se observa inmunodominancia.

El epítopo F249-258 es interesante en cuanto al desarrollo de vacunas frente a VRS humano en modelos murinos, ya que además de estar localizado cerca del sitio antigénico II para anticuerpos neutralizantes (López y col. 1998), se presenta por una vía exógena a CTL, abriendo la posibilidad de activar CTL *in vivo* con un virus no infeccioso o incluso con proteína purificada. De hecho se sabe que VRS infecta células dendríticas humanas *in vitro* (de Graaff y col. 2005; Jones y col. 2006), y se ha demostrado la incorporación de antígeno de VRS bovino mediante caveolas por una subpoblación de células dendríticas bovinas *in vitro* (Werling y col. 1999). Por lo tanto, sería posible que durante la infección *in vivo* con VRS las pAPC puedan activar linfocitos T CD8⁺ específicos del epítopo subdominante F249-258 por una vía de presentación cruzada similar a la vía exógena observada en células T2/K^d infectadas con rVV. En este sentido, rVV es más interesante que VRS por los problemas que ha planteado en el pasado el uso de VRS inactivado. Además, en el caso de rVV se ha visualizado la activación *in vivo* de linfocitos T CD8⁺ vírgenes por células dendríticas (Norbury y col. 2002). Queda abierto a investigación futura el estudio de las formas de rVV inactivado que permitirían el acceso a una vía de presentación cruzada para inducir CTL, además de anticuerpos, constituyendo por tanto una adecuada estrategia de vacunación.

6. Conclusiones

1. Se han generado *in vitro* líneas policlonales de CTL multiespecíficas y monoespecíficas de epítomos de la proteína F de la cepa Long del VRS.
2. En la proteína F de la cepa Long del VRS, se conserva el epítomo F85-93 presentado por K^d y descrito en la cepa A2. Sin embargo, no hay ninguna evidencia de la presencia del epítomo F92-106 en la cepa Long.
3. La secuencia F249-258 de la proteína F de la cepa Long del VRS es un nuevo epítomo presentado por K^d a CTL como nonámero (TYMLTNSEL) o decámero (TYMLTNSELL). La infección *in vivo* de ratones BALB/c con VRS o con un virus vaccinia recombinante que codifica la proteína F del VRS induce CTL frente a este epítomo.
4. En la respuesta inmune *in vivo* mediada por linfocitos T CD8⁺ en ratones BALB/c infectados con un virus vaccinia recombinante que codifica la proteína F del VRS, se va estableciendo una inmunodominancia de F85-93 sobre F249-258, siendo la línea policlonal multiespecífica CTL F/BCH4 representativa de este patrón de inmunodominancia.
5. Los epítomos de la proteína F del VRS F85-93 y F249-258 presentados por K^d son procesados por vías diferentes dependiendo del epítomo, de la forma de proteína F, y de su contexto viral.
 - a. El epítomo F85-93 es procesado por una vía endógena dependiente de TAP en células infectadas con VRS o con virus vaccinia recombinantes. En este último caso, el proteasoma degrada la proteína F nativa, citosólica, o retenida antes del compartimento intermedio del Golgi. Además, cuando la proteína F nativa no está en su contexto natural, sino en el del virus vaccinia, F85-93 se procesa también por una vía endógena independiente de TAP y sensible a aminopeptidasas.
 - b. El epítomo F249-258 es presentado por una vía independiente de TAP, que es endógena cuando la proteína F está en su contexto natural, o fundamentalmente exógena cuando la proteína F nativa o su forma citosólica están codificadas en un virus vaccinia recombinante.
 - c. Ninguno de los epítomos se procesa por la vía endógena independiente de TAP mediada por furina.

7. Bibliografía

- Abastado, J.P., Jaulin, C., Schutze, M.P., Langlade-Demoyen, P., Plata, F., Ozato, K., Kourilsky, P.** (1987). Fine mapping of epitopes by intradomain K^d/D^d recombinants. *J. Exp. Med.* **166**:327-340.
- Ackerman, A.L., Cresswell, P.** (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol.* **5**:678-684.
- Andersen, M.H., Bonfill, J.E., Neisig, A., Arsequell, G., Søndergaard, I., Neefjes, J., Zeuthen, J., Elliot, T., Haurum, J.S.** (1999). Phosphorylated peptides can be transported by TAP molecules, presented by class I MHC molecules, and recognized by phosphopeptide-specific CTL. *J. Immunol.* **163**:3812-3818.
- Bacik, I., Cox, J.H., Anderson, R., Yewdell, J.W., Bennink, J.R.** (1994). TAP (transporter associated with antigen processing)-independent presentation of endogenously synthesized peptides is enhanced by endoplasmic reticulum insertion sequences located at the amino- but not carboxyl-terminus of the peptide. *J. Immunol.* **152**:381-387.
- Bangham, C.R., McMichael, A.J.** (1986). Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:9183-9187.
- Barry, M., Bleackley, R.C.** (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:401-409.
- Belz, G.T., Xie, W., Altman, J.D., Doherty, P.C.** (2000). A previously unrecognized H-2D^b-restricted peptide prominent in the primary influenza A virus-specific CD8⁺ T-cell response is much less apparent following secondary challenge. *J. Virol.* **74**:3486-3493.
- Bembridge, G.P., López, J.A., Cook, R., Melero, J.A., Taylor, G.** (1998). Recombinant vaccinia virus coexpressing the F protein of respiratory syncytial virus (RSV) and interleukin-4 (IL-4) does not inhibit the development of RSV-specific memory cytotoxic T lymphocytes, whereas priming is diminished in the presence of high levels of IL-2 or gamma interferon. *J. Virol.* **72**:4080-4087.
- Bembridge, G.P., López, J.A., Bustos, R., Melero, J.A., Cook, R., Mason, H., Taylor, G.** (1999). Priming with a secreted form of the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) promotes interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production but not pulmonary eosinophilia following RSV challenge. *J. Virol.* **73**:10086-10094.
- Bembridge, G.P., Rodríguez, N., García-Beato, R., Nicolson, C., Melero, J.A., Taylor, G.** (2000). DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J. Gen. Virol.* **81**:2519-2523.
- Beninga, J., Rock, K.L., Goldberg, A.L.** (1998). Interferon- γ can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **273**:18734-18742.
- Blasco, R. Moss, B.** (1995). Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* **158**:157-162.
- Blake, N., Lee, S., Redchenko, I., Thomas, W., Steven, N., Leese, A., Steigerwald-Mullen, P., Kurilla, M.G., Frappier, L., Rickinson, A.** (1997). Human CD8⁺ T cell responses to EBV EBNA1: HLA class I presentation of the (Gly-Ala)-containing protein requires exogenous processing. *Immunity* **7**:791-802.
- Bolt, G., Pedersen, L.Ø., Birkeslund, H.H.** (2000). Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Res.* **68**:25-33.
- Brock, S.C., Heck, J.M., McGraw, P.A., Crowe, J.E., Jr.** (2005). The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation-independent apical plasma membrane sorting sequence. *J. Virol.* **79**:12528-12535.

- Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., Chapuis, B.** (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**:181-196.
- Calder, L.J., González-Reyes, L., García-Barreno, B., Wharton, S.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C., Melero, J.A.** (2000). Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* **271**:122-131.
- Cannon, M.J., Stott, E.J., Taylor, G., Askonas, B.A.** (1987). Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells. *Immunology* **62**:133-138.
- Cannon, M.J., Openshaw, P.J.M., Askonas, B.A.** (1988). Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* **168**:1163-1168.
- Carbone, F.R., Bevan, M.J.** (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen *in vivo*. *J. Exp. Med.* **171**:377-387.
- Cerundolo, V., Benham, A., Braud, V., Mukherjee, S., Gould, K., Macino, B., Neefjes, J., Townsend, A.** (1997). The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur. J. Immunol.* **27**:336-341.
- Chakrabarti, S., Brechling, K., Moss, B.** (1985). Vaccinia virus expression vector: coexpression of β -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3403-3409.
- Chang, J., Srikiatkachorn, A., Braciale, T.J.** (2001). Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8^+ T cells during experimental virus infection. *J. Immunol.* **167**:4254-4260.
- Chang, J., Braciale, T.J.** (2002). Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8^+ T-cell effector activity and peripheral CD8^+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat. Med.* **8**:54-60.
- Chang, S.C., Momburg, F., Bhutani, N., Goldberg, A.L.** (2005). The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:17107-17112.
- Chen, W., Antón, L.C., Bennink, J.R., Yewdell, J.W.** (2000). Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* **12**:83-93.
- Collins, P.L., Mottet, G.** (1991). Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **72**:3095-3101.
- Collins, P.L., Chanock, R.M., Murphy, B.R.** (2001). Respiratory syncytial virus. En *Fields Virology*, 4th ed. D.M. Knipe, P.M. Howley, eds (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). p. 1443-1485.
- Coupar, B.E., Andrew, M.E., Both, G.W., Boyle, D.B.** (1986). Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response. *Eur. J. Immunol.* **16**:1479-1487.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L., Rock, K.L.** (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **272**:13437-13445.
- Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R., Wearsch, P.A.** (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* **207**:145-157.
- Crowe, S.R., Turner, S.J., Miller, S.C., Roberts, A.D., Rappolo, R.A., Doherty, P.C., Ely, K.H., Woodland, D.L.** (2003). Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8^+ T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *J. Exp. Med.* **198**:399-410.

- Crumpacker, D.B., Alexander, J., Cresswell, P., Engelhard, V.H.** (1992). Role of endogenous peptides in murine allogeneic cytotoxic T cell responses assessed using transfectants of the antigen-processing mutant 174xCEM.T2. *J. Immunol.* **148**:3004-3011.
- De Graaff, P.M.A., de Jong, E.C., van Capel, T.M., van Dijk, M.E.A., Roholl, P.J.M., Boes, J., Luytjes, W., Kimpen, J.L.L., van Bleek, G.M.** (2005). Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *J. Immunol.* **175**:5904-5911.
- Del Val, M., Volkmer, H., Rothbard, J.B., Jonjić, S., Messerle, M., Schickedanz, J., Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H.** (1988). Molecular basis for cytolytic T-lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus immediate-early protein pp89. *J. Virol.* **62**:3965-3972.
- Del Val, M., Schlicht, H.J., Ruppert, T., Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H.** (1991). Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* **66**:1145-1153.
- Del Val, M., López, D.** (2002). Multiple proteases process viral antigens for presentation by MHC class I molecules to CD8⁺ T lymphocytes. *Mol. Immunol.* **39**:235-247.
- Ehl, S., Bischoff, R., Ostler, T., Vallbracht, S., Schulte-Mönting, J., Poltorak, A., Freudenberg, M.** (2004). The role of Toll-like receptor 4 versus interleukin-12 in immunity to respiratory syncytial virus. *Eur. J. Immunol.* **34**:1146-1153.
- Eisenlohr, L.C., Bacik, I., Bennink, J.R., Bernstein, K., Yewdell, J.W.** (1992a). Expression of a membrane protease enhances presentation of endogenous antigens to MHC class I-restricted T lymphocytes. *Cell* **71**:963-972.
- Eisenlohr, L.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R.** (1992b). Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **175**:481-487.
- Elliott, T., Willis, A., Cerundolo, V., Townsend, A.** (1995). Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* **181**:1481-1491.
- Elliott, T., Williams, A.** (2005). The optimization of peptide cargo bound to MHC class I molecules by the peptide-loading complex. *Immunol. Rev.* **207**:89-99.
- Falo, L.D., Jr., Colarusso, L.J., Benacerraf, B., Rock, K.L.** (1992). Serum proteases alter the antigenicity of peptides presented by class I major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:8347-8350.
- Fernie, B.F., Ford, E.C., Gerin, J.L.** (1981). The development of Balb/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on the cell surface. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **167**:83-86.
- Gaddum, R.M., Cook, R.S., Wyld, S.G., López, J.A., Bustos, R., Melero, J.A., Taylor, G.** (1996). Mutant forms of the F protein of human respiratory syncytial (RS) virus induce a cytotoxic T lymphocyte response but not a neutralizing antibody response and only transient resistance to RS virus infection. *J. Gen. Virol.* **77**:1239-1248.
- Gadola, S.D., Moins-Teisserenc, H.T., Trowsdale, J., Gross, W.L., Cerundolo, V.** (2000). TAP deficiency syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **121**:173-178.
- Garbi, N., Tanaka, S., van den Broek, M., Momburg, F., Hämmerling, G.J.** (2005). Accessory molecules in the assembly of major histocompatibility complex class I/peptide complexes: how essential are they for CD8⁺ T-cell immune responses?. *Immunol. Rev.* **207**:77-88.
- García-Barreno, B., Jorcano, J.L., Aukenbauer, T., López-Galíndez, C., Melero, J.A.** (1988). Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus (RSV). *Virus Res.* **9**:307-321.

- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schafer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D.** (1994). Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* **76**:217-225.
- Gil-Torregrosa, B.C., Castaño, A.R., Del Val, M.** (1998). Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the *trans*-Golgi network protease furin. *J. Exp. Med.* **188**:1105-1116.
- Gil-Torregrosa, B.C., Castaño, A.R., López, D., Del Val, M.** (2000). Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic* **1**:641-651.
- González-Reyes, L., Ruiz-Argüello, M.B., García-Barreno, B., Calder, L., López, J.A., Albar, J.P., Skehel, J.J., Wiley, D.C., Melero, J.A.** (2001). Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:9859-9864.
- Graham, B.S., Bunton, L.A., Wright, P.F., Karzon, D.T.** (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J. Clin. Invest.* **88**:1026-1033.
- Grommé, M., Uytdehaag, F.G.C.M., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J.H., Tulp, A., Verwoerd, D., Neefjes, J.** (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:10326-10331.
- Groothuis, T.A., Griekspoor, A.C., Neijssen, J.J., Herberts, C.A., Neefjes, J.J.** (2005). MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunol. Rev.* **207**:60-76.
- Hammer, G.E., González, F., Champsaur, M., Cado, D., Shastri, N.** (2006). The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat. Immunol.* **7**:103-112.
- Hammond, S.A., Bollinger, R.C., Tobery, T.W., Siliciano, R.F.** (1993). Transporter-independent processing of HIV-1 envelope protein for recognition by CD8⁺ T cells. *Nature* **364**:158-161.
- Hammond, S.A., Johnson, R.P., Kalams, S.A., Walker, B.D., Takiguchi, M., Safrit, J.T., Koup, R.A., Siliciano, R.F.** (1995). An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway and a more general TAP-1/2-dependent antigen-processing pathway allow recognition of the HIV-1 envelope glycoprotein by CD8⁺ CTL. *J. Immunol.* **154**:6140-6156.
- Haurum, J.S., Høier, I.B., Arsequell, G., Neisig, A., Valencia, G., Zeuthen, J., Neefjes, J., Elliott, T.** (1999). Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules in vivo. *J. Exp. Med.* **190**:145-150.
- Henderson, R.A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D.F., Engelhard, V.H.** (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* **255**:1264-1266.
- Hussell, T., Baldwin, C.J., O'Garra, A., Openshaw, P.J.M.** (1997). CD8⁺ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. *Eur. J. Immunol.* **27**:3341-3349.
- Jaraquemada, D., Marti, M., Long, E.O.** (1990). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **172**:947-954.
- Jiang, S., Borthwick, N.J., Morrison, P., Gao, G.F., Steward, M.W.** (2002). Virus-specific CTL responses induced by an H-2K^d-restricted, motif-negative 15-mer peptide from the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **83**:429-438.
- Johnson, S., Griego, S.D., Pfarr, D.S., Doyle, M.L., Woods, R., Carlin, D., Prince, G.A., Koenig, S., Young, J.F., Dillon, S.B.** (1999). A direct comparison of the activities of two humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibodies: MEDI-493 and RSHZI9. *J. Infect. Dis.* **180**:35-40.

- Jones, A., Morton, I., Hobson, L., Evans, G.S., Everard, M.L.** (2006). Differentiation and immune function of human dendritic cells following infection by respiratory syncytial virus. *Clin. Exp. Immunol.* **143**:513-522.
- Keşmir, C., Nussbaum, A.K., Schild, H., Detours, V., Brunak, S.** (2002). Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng.* **15**:287-296.
- Kim, H.W., Canchola, J.G., Brandt, C.D., Pyles, G., Chanock, R.M., Jensen, K., Parrott, R.H.** (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**:422-434.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., Goldberg, A.L.** (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274**:3363-3371.
- Kloetzel, P.M.** (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* **5**:661-669.
- Kloetzel, P.M., Ossendorp, F.** (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**:76-81.
- Koopmann, J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hämmerling, G.J., Momburg, F.** (1996). Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* **26**:1720-1728.
- Koopmann, J.O., Albring, J., Hüter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hämmerling, G.J., Momburg, F.** (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* **13**:117-127.
- Kulkarni, A.B., Collins, P.L., Bacik, I., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., Crowe, J.E., Jr., Murphy, B.R.** (1995). Cytotoxic T cells specific for a single peptide on the M2 protein of respiratory syncytial virus are the sole mediators of resistance induced by immunization with M2 encoded by a recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* **69**:1261-1264.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., Finberg, R.W.** (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **1**:398-401.
- Lautscham, G., Mayrhofer, S., Taylor, G., Haigh, T., Leese, A., Rickinson, A., Blake, N.** (2001). Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8⁺ T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway. *J. Exp. Med.* **194**:1053-1068.
- Lévy, F., Gabathuler, R., Larsson, R., Kvist, S.** (1991). ATP is required for *in vitro* assembly of MHC class I antigens but not for transfer of peptides across the ER membrane. *Cell* **67**:265-274.
- Lévy, F., Burri, L., Morel, S., Peitrequin, A.L., Lévy, N., Bachi, A., Hellman, U., Van den Eynde, B.J., Servis, C.** (2002). The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J. Immunol.* **169**:4161-4171.
- Li, X., Sambhara, S., Li, C.X., Ewasyshyn, M., Parrington, M., Caterini, J., James, O., Cates, G., Du, R.P., Klein, M.** (1998). Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J. Exp. Med.* **188**:681-688.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J.G., Schweizer, A., Berger, E.G., Hauri, H.P., Yuan, L.C., Klausner, R.D.** (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**:821-836.

- Liu, T.M., Zhou, X., Örvell, C., Lederer, E., Ljunggren, H.G., Jondal, M.** (1995). Heat-inactivated Sendai virus can enter multiple MHC class I processing pathways and generate cytotoxic T lymphocyte responses *in vivo*. *J. Immunol.* **154**:3147-3155.
- López, D., Del Val, M.** (1997). Selective involvement of proteasomes and cysteine proteases in MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* **159**:5769-5772.
- López, J.A., Villanueva, N., Melero, J.A., Portela, A.** (1988). Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res.* **10**:249-261.
- López, J.A., Bustos, R., Portela, A., García-Barreno, B., Melero, J.A.** (1996). A point mutation in the F₁ subunit of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein blocks its cell surface transport at an early stage of the exocytic pathway. *J. Gen. Virol.* **77**:649-660.
- López, J.A., Bustos, R., Örvell, C., Berois, M., Arbiza, J., García-Barreno, B., Melero, J.A.** (1998). Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Virol.* **72**:6922-6928.
- Lu, J., Wettstein, P.J., Higashimoto, Y., Appella, E., Celis, E.** (2001). TAP-independent presentation of CTL epitopes by trojan antigens. *J. Immunol.* **166**:7063-7071.
- Lu, J., Higashimoto, Y., Appella, E., Celis, E.** (2004). Multiepitope trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses. *J. Immunol.* **172**:4575-4582.
- Martínez, I., Bustos, J., Melero, J.A.** (2001). Reduced expression of surface glycoproteins in mouse fibroblasts persistently infected with human respiratory syncytial virus (HRSV). *Arch. Virol.* **146**:669-683.
- Meacock, S.L., Greenfield, J.J.A., High, S.** (2000). Protein targeting and translocation at the endoplasmic reticulum membrane—through the eye of a needle? *Essays Biochem.* **36**:1-13.
- Montoya, M., Del Val, M.** (1999). Intracellular rate-limiting steps in MHC class I antigen processing. *J. Immunol.* **163**:1914-1922.
- Moss, B., Ahn, B.Y., Amegadzie, B., Gershon, P.D., Keck, J.G.** (1991). Cytoplasmic transcription system encoded by vaccinia virus. *J. Biol. Chem.* **266**:1355-1358.
- Moss, B.** (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:11341-11348.
- Moss, B.** (2001). *Poxviridae: the viruses and their replication*. En *Fields Virology*, 4th ed. D.M. Knipe, P.M. Howley, eds (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). p. 2849-2883.
- Neefjes, J.J., Momburg, F., Hämmerling, G.J.** (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261**:769-771.
- Neefjes, J., Gottfried, E., Roelse, J., Grommé, M., Obst, R., Hämmerling, G.J., Momburg, F.** (1995). Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur. J. Immunol.* **25**:1133-1136.
- Neumeister, C., Nanan, R., Cornu, T.I., Lüder, C.G.K., ter Meulen, V., Naim, H., Niewiesk, S.** (2001). Measles virus and canine distemper virus target proteins into a TAP-independent MHC class I-restricted antigen-processing pathway. *J. Gen. Virol.* **82**:441-447.
- Norbury, C.C., Malide, D., Gibbs, J.S., Bennink, J.R., Yewdell, J.W.** (2002). Visualizing priming of virus-specific CD8⁺ T cells by infected dendritic cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* **3**:265-271.
- Nussbaum, A.K., Kuttler, C., Tenzer, S., Schild, H.** (2003). Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes. *Curr. Opin. Immunol.* **15**:69-74.

- Oliveira, V., Campos, M., Melo, R.L., Ferro, E.S., Camargo, A.C.M., Juliano, M.A., Juliano, L.** (2001). Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligo-peptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. *Biochemistry* **40**:4417-4425.
- Olmsted, R.A., Elango, N., Prince, G.A., Murphy, B.R., Johnson, P.R., Moss, B., Chanock, R.M., Collins, P.L.** (1986). Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:7462-7466.
- Openshaw, P.J.M., Tregoning, J.S.** (2005). Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:541-555.
- Paliard, X., Doe, B., Selby, M.J., Hartog, K., Lee, A.Y., Burke, R.L., Walker, C.M.** (2001). Induction of herpes simplex virus gB-specific cytotoxic T lymphocytes in TAP1-deficient mice by genetic immunization but not HSV infection. *Virology* **282**:56-64.
- Parker, K.C., Bednarek, M.A., Coligan, J.E.** (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* **152**:163-175.
- Paterson, R.G., Lamb, R.A.** (1987). Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a paramyxovirus F protein to act as a membrane anchor. *Cell* **48**:441-452.
- Peisajovich, S.G., Samuel, O., Shai, Y.** (2000). Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion. *J. Mol. Biol.* **296**:1353-1365.
- Pemberton, R.M., Cannon, M.J., Openshaw, P.J.M., Ball, L.A., Wertz, G.W., Askonas, B.A.** (1987). Cytotoxic T cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: fusion protein is an important target antigen. *J. Gen. Virol.* **68**:2177-2182.
- Peters, B., Bulik, S., Tampe, R., van Endert, P.M., Holzhütter, H.G.** (2003). Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J. Immunol.* **171**:1741-1749.
- Petersen, J.L., Morris, C.R., Solheim, J.C.** (2003). Virus evasion of MHC class I molecule presentation. *J. Immunol.* **171**:4473-4478.
- Portaro, F.C., Gomes, M.D., Cabrera, A., Fernandes, B.L., Silva, C.L., Ferro, E.S., Juliano, L., de Camargo, A.C.M.** (1999). Thimet oligopeptidase and the stability of MHC class I epitopes in macrophage cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**:596-601.
- Powis, S.J., Young, L.L., Joly, E., Barker, P.J., Richardson, L., Brandt, R.P., Melief, C.J., Howard, J.C., Butcher, G.W.** (1996). The rat *cim* effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* **4**:159-165.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bennink, J.R., Yewdell, J.W.** (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**:343-354.
- Rammensee, H.G., Bachmann, J., Emmerich, N.P.N., Bachor, O.A., Stevanović, S.** (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**:213-219.
- Ray, K., Hines, C.S., Coll-Rodríguez, J., Rodgers, D.W.** (2004). Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. *J. Biol. Chem.* **279**:20480-20489.
- Reed, R.C., Nicchitta, C.V.** (2000). Chaperone-mediated cross-priming: a hitchhiker's guide to vesicle transport. *Int. J. Mol. Med.* **6**:259-264.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W., Neefjes, J.** (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**:97-108.

- Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J.W., Neefjes, J.** (2004). A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* **20**:495-506.
- Restifo, N.P., Bačák, I., Irvine, K.R., Yewdell, J.W., McCabe, B.J., Anderson, R.W., Eisenlohr, L.C., Rosenberg, S.A., Bennink, J.R.** (1995). Antigen processing *in vivo* and the elicitation of primary CTL responses. *J. Immunol.* **154**:4414-4422.
- Risco, C., Rodríguez, J.R., López-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Esteban, M., Rodríguez, D.** (2002). Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J. Virol.* **76**:1839-1855.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L.** (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**:761-771.
- Rock, K.L., York, I.A., Goldberg, A.L.** (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* **5**:670-677.
- Salter, R.D., Howell, D.N., Cresswell, P.** (1985). Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**:235-246.
- Samino, Y., López, D., Guil, S., Saveanu, L., van Endert, P.M., Del Val, M.** (2006). A long N-terminal-extended nested set of abundant and antigenic major histocompatibility complex class I natural ligands from HIV envelope protein. *J. Biol. Chem.* **281**:6358-6365.
- Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., Goldberg, A.L.** (2002). An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**:1169-1176.
- Saric, T., Graef, C.I., Goldberg, A.L.** (2004). Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J. Biol. Chem.* **279**:46723-46732.
- Saveanu, L., Carroll, O., Hassainya, Y., van Endert, P.** (2005a). Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol. Rev.* **207**:42-59.
- Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., López, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., van Endert, P.M.** (2005b). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **6**:689-697.
- Schirmbeck, R., Reimann, J.** (1994). Peptide transporter-independent, stress protein-mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *Eur. J. Immunol.* **24**:1478-1486.
- Schirmbeck, R., Reimann, J.** (2002). Alternative processing of endogenous or exogenous antigens extends the immunogenic, H-2 class I-restricted peptide repertoire. *Mol. Immunol.* **39**:249-259.
- Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U., Conzelmann, K.K.** (2000). Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* **74**:8234-8242.
- Schlender, J., Zimmer, G., Herrler, G., Conzelmann, K.K.** (2003). Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J. Virol.* **77**:4609-4616.
- Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G.** (1994). Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J. Virol.* **68**:130-147.

- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**:770-774.
- Schwarze, J., Cieslewicz, G., Joetham, A., Ikemura, T., Hamelmann, E., Gelfand, E. (1999a). CD8 T cells are essential in the development of respiratory syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* **162**:4207-4211.
- Schwarze, J., Mäkelä, M.J., Cieslewicz, G., Dakhama, A., Lahn, M., Ikemura, T., Joetham, A., Gelfand, E.W. (1999b). Transfer of the enhancing effect of respiratory syncytial virus infection on subsequent allergic airway sensitization by T lymphocytes. *J. Immunol.* **163**:5729-5734.
- Seifert, U., Marañón, C., Shmueli, A., Desoutter, J-F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P.M., Reiss Y., Hosmalin, A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* **4**:375-379.
- Serwold, T., Gaw, S., Shastri, N. (2001). ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat. Immunol.* **2**:644-651.
- Serwold, T., González, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**:480-483.
- Shastri, N., Cardinaud, S., Schwab, S.R., Serwold, T., Kunisawa, J. (2005). All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol. Rev.* **207**:31-41.
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation *in vivo*. *Immunity* **21**:155-165.
- Shepherd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A., Jr., Tonegawa, S. (1993). TAP1-dependent peptide translocation *in vitro* is ATP dependent and peptide selective. *Cell* **74**:577-584.
- Silva, C.L., Portaro, F.C.V., Bonato, V.L.D., de Camargo, A.C.M., Ferro, E.S. (1999). Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**:591-595.
- Simoes, E.A. (1999). Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* **354**:847-852.
- Simoes, E.A.F., Carbonell-Estrany, X. (2003). Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**:S13-S18.
- Smith, D.C., Gallimore, A., Jones, E., Roberts, B., Lord, J.M., Deeks, E., Cerundolo, V., Roberts, L.M. (2002a). Exogenous peptides delivered by ricin require processing by signal peptidase for transporter associated with antigen processing-independent MHC class I-restricted presentation. *J. Immunol.* **169**:99-107.
- Smith, B.J., Lawrence, M.C., Colman, P.M. (2002b). Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. *Protein Eng.* **15**:365-371.
- Snyder, H.L., Bačík, I., Bennink, J.R., Kearns, G., Behrens, T.W., Bächli, T., Orlowski, M., Yewdell, J.W. (1997). Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* **186**:1087-1098.
- Snyder, H.L., Bačík, I., Yewdell, J.W., Behrens, T.W., Bennink, J.R. (1998). Promiscuous liberation of MHC-class I-binding peptides from the C termini of membrane and soluble proteins in the secretory pathway. *Eur. J. Immunol.* **28**:1339-1346.
- Srikiatkachorn, A., Braciale, T.J. (1997). Virus-specific CD8⁺ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J. Exp. Med.* **186**:421-432.

- Stein, R.T., Sherrill, D., Morgan, W.J., Holberg, C.J., Halonen, M., Taussig, L.M., Wright, A.L., y Martinez, F.D.** (1999). Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* **354**:541-545.
- Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schöter, C., Thompson, M.W., Hersh, L.B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Schild, H.** (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* **1**:413-418.
- Stott, E.J., Taylor, G., Ball, L.A., Anderson, K., Young, K.K., King, A.M.Q., Wertz, G.W.** (1987). Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **61**:3855-3861.
- Strehl, B., Seifert, U., Krüger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.M.** (2005). Interferon- γ , the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* **207**:19-30.
- Sugrue, R.J., Brown, C., Brown, G., Aitken, J., Rixon, H.W.McL.** (2001). Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **82**:1375-1386.
- Suri, A., Walters, J.J., Levisetti, M.G., Gross, M.L., Unanue, E.R.** (2006). Identification of naturally processed peptides bound to the class I MHC molecule H-2K^d of normal and TAP-deficient cells. *Eur. J. Immunol.* **36**:544-557.
- Tanioka, T., Hattori, A., Masuda, S., Nomura, Y., Nakayama, H., Mizutani, S., Tsujimoto, M.** (2003). Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase: the third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* **278**:32275-32283.
- Taylor, G., Stott, E.J., Bew, M., Fernie, B.F., Cote, P.J., Collins, A.P., Hughes, M., Jebbett, J.** (1984). Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology* **52**:137-142.
- Teng, M.N., Collins, P.L.** (1998). Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J. Virol.* **72**:5707-5716.
- The IMPact-RSV Study Group** (1998). Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* **102**:531-537.
- Thomas, G.** (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:753-766.
- Tomkinson, B.** (1999). Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem. Sci.* **24**:355-359.
- Townsend, A.R., Bastin, J., Gould, K., Brownlee, G.G.** (1986). Cytotoxic T lymphocytes recognize influenza haemagglutinin that lacks a signal sequence. *Nature* **324**:575-577.
- Tripp, R.A., Jones, L.P., Haynes, L.M., Zheng, H., Murphy, P.M., Anderson, L.J.** (2001). CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat. Immunol.* **2**:732-738.
- Trombetta, E.S., Mellman, I.** (2005). Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:975-1028.
- Turzynski, A., Mentlein, R.** (1990). Prolyl aminopeptidase from rat brain and kidney. Action on peptides and identification as leucyl aminopeptidase. *Eur. J. Biochem.* **190**:509-515.
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Liu, M.A.** (1994). Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur. J. Immunol.* **24**:1590-1596.
- Van den Eynde, B.J., Morel, S.** (2001). Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:147-153.

- van der Most, R.G., Sette, A., Oseroff, C., Alexander, J., Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Southwood, S., Sidney, J., Chesnut, R.W., Matloubian, M., Ahmed, R. (1996). Analysis of cytotoxic T cell responses to dominant and subdominant epitopes during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Immunol.* **157**:5543-5554.
- van der Most, R.G., Concepcion, R.J., Oseroff, C., Alexander, J., Southwood, S., Sidney, J., Chesnut, R.W., Ahmed, R., Sette, A. (1997). Uncovering subdominant cytotoxic T-lymphocyte responses in lymphocytic choriomeningitis virus-infected BALB/c mice. *J. Virol.* **71**:5110-5114.
- van der Most, R.G., Murali-Krishna, K., Whitton, J.L., Oseroff, C., Alexander, J., Southwood, S., Sidney, J., Chesnut, R.W., Sette, A., Ahmed, R. (1998). Identification of D^b- and K^b-restricted subdominant cytotoxic T-cell responses in lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. *Virology* **240**:158-167.
- van Endert, P.M., Tampé, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F., McDevitt, H.O. (1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* **1**:491-500.
- van Endert, P.M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., Bach, J.F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* **182**:1883-1895.
- Vey, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Klenk, H.D., Garten, W. (1994). Maturation of the *trans*-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J. Cell. Biol.* **127**:1829-1842.
- Wei, M.L., Cresswell, P. (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**:443-446.
- Werling, D., Hope, J.C., Chaplin, P., Collins, R.A., Taylor, G., Howard, C.J. (1999). Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **66**:50-58.
- Yewdell, J.W., Bennink, J.R., Hosaka, Y. (1988). Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* **239**: 637-640.
- Yewdell, J.W., Antón, L.C., Bennink, J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* **157**:1823-1826.
- Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:51-88.
- Yewdell, J. (2002). To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Mol. Immunol.* **39**:139-146.
- Yewdell, J.W., Reits, E., Neefjes, J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:952-961.
- Yewdell, J.W., Del Val, M. (2004). Immunodominance in T_{CD8+} responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* **21**:149-153.
- Yewdell, J.W., Haeryfar, S.M.M. (2005). Understanding presentation of viral antigens to CD8⁺ T cells *in vivo*: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:651-682.
- York, I.A., Chang, S.C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., Rock, K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* **3**:1177-1184.
- York, I.A., Mo, A.X.Y., Lemerise, K., Zeng, W.Y., Shen, Y.L., Abraham, C.R., Saric, T., Goldberg, A.L., Rock, K.L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* **18**:429-440.

- Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V.N., Kim, P.S.** (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:14172-14177.
- Zhou, X., Glas, R., Liu, T., Ljunggren, H.G., Jondal, M.** (1993). Antigen processing mutant T2 cells present viral antigen restricted through H-2K^b. *Eur. J. Immunol.* **23**:1802-1808.
- Zhou, X., Momburg, F., Liu, T., Abdel Motal, U.M., Jondal, M., Hämmerling, G.J., Ljunggren, H.G.** (1994). Presentation of viral antigens restricted by H-2K^b, D^b or K^d in proteasome subunit LMP2- and LMP7-deficient cells. *Eur. J. Immunol.* **24**:1863-1868.
- Zimmer, G., Budz, L., Herrler, G.** (2001). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem.* **276**:31642-31650.
- Zweerink, H.J., Gammon, M.C., Utz, U., Sauma, S.Y., Harrer, T., Hawkins, J.C., Johnson, R.P., Sirotina, A., Hermes, J.D., Walker, B.D., Biddison, W.E.** (1993). Presentation of endogenous peptides to MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells. *J. Immunol.* **150**:1763-1771.

Anexo

Los resultados presentados en los apartados 4.1. y 4.2. han sido publicados en el siguiente artículo, estando en preparación el manuscrito para la publicación de los resultados del apartado 4.3.

Johnstone, C., de León, P., Medina, F., Melero, J.A., García-Barreno, B., Del Val, M. (2004). Shifting immunodominance pattern of two cytotoxic T-lymphocyte epitopes in the F glycoprotein of the Long strain of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **85**:3229-3238.

Shifting immunodominance pattern of two cytotoxic T-lymphocyte epitopes in the F glycoprotein of the Long strain of respiratory syncytial virus

Carolina Johnstone,¹ Patricia de León,¹ Francisco Medina,¹
José A. Melero,² Blanca García-Barreno² and Margarita Del Val¹

Correspondence
Margarita Del Val
mdval@isciii.es

Unidades de Inmunología Viral¹ and Biología Viral², Centro Nacional de Microbiología,
Instituto de Salud Carlos III, Ctra Pozuelo km 2, E-28220 Majadahonda (Madrid), Spain

Human respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of respiratory infection in children and in the elderly. The RSV fusion (F) glycoprotein has long been recognized as a vaccine candidate as it elicits cytotoxic T-lymphocyte (CTL) and antibody responses. Two murine H-2K^d-restricted CTL epitopes (F85–93 and F92–106) are known in the F protein of the A2 strain of RSV. F-specific CTL lines using BCH4 fibroblasts that are persistently infected with the Long strain of human RSV as stimulators were generated, and it was found that in this strain only the F85–93 epitope is conserved. Motif based epitope prediction programs and an F2 chain deleted F protein encoded in a recombinant vaccinia virus enabled identification of a new epitope in the Long strain, F249–258, which is presented by K^d as a 9-mer (TYMLTNSSEL) or a 10-mer (TYMLTNSSELL) peptide. The results suggest that the 10-mer might be a naturally processed endogenous K^d ligand. The CD8⁺ T-lymphocyte responses to epitopes F85–93 and F249–258 present in the F protein of RSV Long were found to be strongly skewed to F85–93 in *in vitro* multispecific CTL lines and *in vivo* during a secondary response to a recombinant vaccinia virus that expresses the entire F protein. However, no hierarchy in CD8⁺ T-lymphocyte responses to F85–93 and F249–258 epitopes was observed *in vivo* during a primary response.

Received 23 April 2004

Accepted 21 July 2004

INTRODUCTION

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of lower respiratory tract infection in infants and young children (Collins *et al.*, 2001), affecting also immunocompromised patients and the elderly. Reinfection is common and currently no effective vaccine is available (Simoes, 1999).

Immune mechanisms involved in RSV disease and protection are not well understood. Protection is mediated mainly by neutralizing antibodies directed to the two virion surface glycoproteins, while clearance of virus-infected cells requires CD8⁺ T lymphocytes. Studies in the mouse model of human RSV have shown that CD8⁺ T lymphocytes play a role both in lung pathology and viral clearance (Cannon *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1991). CD8⁺ T lymphocytes are thought to regulate differentiation and activation of Th2 CD4⁺ T lymphocytes, which mediate lung pathology by recruiting eosinophils into the lungs during RSV infection (Srikiatkachorn & Braciale, 1997). On the other hand, CD8⁺ T lymphocytes specific for the matrix 2 (M2) M2_{82–92} epitope have been found to be the sole mediators of resistance to RSV infection in BALB/c mice infected with a recombinant vaccinia virus (rVV) expressing the M2 protein of RSV (Kulkarni *et al.*, 1995). Further studies found that RSV infection altered CD8⁺ effector activity and

memory T lymphocytes selectively in the lungs (Chang & Braciale, 2002; Chang *et al.*, 2001). This RSV-induced immune dysregulation of virus-specific CD8⁺ T lymphocytes has been suggested as a possible mechanism for the absence of durable long-lived immunity to RSV infection (Chang & Braciale, 2002).

The fusion (F) protein of RSV, one of the two major surface glycoproteins in the virion, has long been recognized as a major vaccine candidate as it is an important target antigen for virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Pemberton *et al.*, 1987) and neutralizing antibodies (Olmsted *et al.*, 1986). Monoclonal antibodies to the F glycoprotein, which is highly conserved among the two antigenic groups of human RSV, passively protect against human RSV challenge in the mouse (Taylor *et al.*, 1984) and reduce the severity of disease in premature and newborn babies (The IMPact-RSV Study Group, 1998). Furthermore, immunization of mice with rVV (Olmsted *et al.*, 1986; Stott *et al.*, 1987) or plasmid DNA encoding the F protein (Bembridge *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1998), which induce F-specific antibodies and CTL, confers protection against challenge with RSV of either antigenic group.

Human RSV F glycoprotein is synthesized as a 574 aa F0 precursor that is processed at two cleavage residues (109

and 136) by furin-like proteases (González-Reyes *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2001). Cleavage yields two chains that remain linked by a disulfide bond. The larger carboxy-terminal F1 chain hosts the fusion peptide, the transmembrane region and several neutralizing antibody antigenic sites (López *et al.*, 1998). The amino-terminal signal sequence is followed by the F2 chain, which has recently been found to be responsible for RSV host-cell specificity suggesting it is the binding partner for specific RSV entry receptors (Schlender *et al.*, 2003). Furthermore, two murine H-2K^d-restricted epitopes recognized by CTL, F85–93 and F92–106, have been identified in the F2 chain of the A2 strain of human RSV (Chang *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002).

In this study, we used a novel approach to generate RSV-specific CTL lines by stimulating primed mouse splenocytes with the BCH4 fibroblast cell line that is persistently infected with the Long strain of RSV (Ferne *et al.*, 1981). We found that the F92–106 epitope is not present in RSV Long whereas the F85–93 epitope is conserved between strains. We searched for CTL epitopes in the F1 chain by using CTL lines, epitope prediction programs and an rVV encoding a mutant F protein, in which the F2 chain was deleted. A novel H-2K^d-restricted epitope, F249–258, was identified. No hierarchy in CD8⁺ T-lymphocyte responses to F85–93 and F249–258 epitopes was found *in vivo* during a primary response to an rVV expressing the full-length F glycoprotein. In contrast, F249–258 was found subdominant with respect to F85–93 in *in vivo* memory and secondary responses, and in CTL lines generated *in vitro*.

METHODS

Viruses. Human RSV Long was grown in HEp-2 monolayers and purified from culture supernatants as described previously (García-Barreno *et al.*, 1988).

Construction of recombinant vvF containing the F gene of RSV Long (VRBF) has been described (Bembridge *et al.*, 1998). An rVV expressing an F protein with aa 34–128 (both included) deleted, vvF-ΔF2, was obtained as follows: plasmid LF1, containing a cDNA copy of the entire F protein gene of the Long strain (Cristina *et al.*, 1990), was mutagenized to introduce a restriction site recognized by *Bbs*I (nt 106, Long sequence; López *et al.*, 1988) and *Afl*III (nt 397), using the Quick-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and appropriate oligonucleotides. The resulting plasmid was digested with *Bbs*I and *Afl*III, treated with Klenow polymerase to make it blunt-ended, and ligated before being used to transform DH5 bacterial cells. Transformants were tested by PCR for the presence of plasmid with the deleted sequence that removed aa 34–128 (both inclusive) from the F2 chain of the F protein. In addition, residue 31 was changed from glutamic to aspartic acid as a consequence of the cloning strategy. The entire F segment of one of the plasmids (LF1-ΔF2) was sequenced and ΔF2 insert was subcloned into plasmid pRB21 (Blasco & Moss, 1995) after digestion with *Bam*HI and *Eco*RI. This plasmid was used to select an rVV of the vRB12 strain by the method of Blasco and Moss (1995). The rVV was plaque-purified three times and expression of F protein was tested by immunofluorescence with specific monoclonal antibody (mAb) 47F (García-Barreno *et al.*, 1989). rVV stocks were grown in CV-1 monolayers and consisted of clarified sonicated cell extracts purified by ultracentrifugation through a 36% sucrose cushion.

Cell lines. P13.1 cell line, a derivative from P815 mastocytoma cells (H-2^d) by transfection with *lacZ* gene encoding β-galactosidase (Carbone & Bevan, 1990), was provided by H.-G. Rammensee (Tübingen University, Tübingen, Germany) and was cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol. Human lymphoblastoid T2 cells deficient in transporters associated with antigen processing and transfected with K^d (Zhou *et al.*, 1994) were provided by G. Hämmerling (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany) and were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol. BALB/c fibroblast cells and human RSV Long persistently infected BCH4 fibroblast cells (Ferne *et al.*, 1981) were obtained from B. Ferne (Georgetown University School of Medicine and Dentistry, Manassas, VA) through G. Taylor (Institute for Animal Health, Compton, UK), and were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum. All cell lines were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Synthetic peptides. Peptides were synthesized in an Applied Biosystems peptide synthesizer (model 433A) and purified. Identity was confirmed by electrospray mass spectrometry by D. López (Centro Nacional de Microbiología, Madrid, Spain). All peptides that tested positive in cytotoxicity assays were found to be homogeneous by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Peptides are named indicating the amino and carboxyl termini in the amino acid sequence of the F protein of RSV Long. Sequences are F31–40, EFYQSTCSAV; F32–40, FYQSTCSAV; F85–93, KYKNAVTEL; F92–106, ELQLLMQSTPAANNR; F249–257, TYMLTNSL; F249–258, TYMLTNSL; F365–373, VFCDTMNSL and F467–475, LYVKGEPII.

Polyclonal CTL lines and cytotoxicity assays. Female BALB/c mice (H-2^d haplotype) bred in our colony were infected by intraperitoneal injection of 10^7 p.f.u. of vvF or vvF-ΔF2. Three weeks post-infection an identical booster was given, and three or more weeks later mice were sacrificed and spleen cells obtained. CTL lines were named indicating the virus used for priming *in vivo* and the agent used for restimulation *in vitro* (Table 1). Thus CTL F/RSV derive from vvF-primed mice and were restimulated *in vitro* with RSV-infected splenocytes, mimicking a described method (Gaddum *et al.*, 1996). Splenocytes from vvF-primed mice were stimulated with naive splenocytes infected for 90 min with RSV Long at a m.o.i. of 0.4 p.f.u. per cell. Recombinant human interleukin 2 (IL2), generously provided by Hoffman-La Roche, was added 5 days later at 25 U ml^{-1} . Long-term cultures were restimulated weekly with IL2 and RSV-infected splenocytes at an effector:stimulator ratio of 3:1. The CTL F/BCH4 and CTL ΔF2/BCH4 lines were generated by stimulating 5×10^6 splenocytes ml^{-1} with 2×10^5 BCH4 cells ml^{-1} .

Table 1. CTL lines used in this study

CTL line*	<i>In vivo</i> priming	<i>In vitro</i> restimulation	Potential epitopes recognized	
			F85–93	F249–258
CTL F/RSV	vvF	RSV	+	+
CTL F/BCH4	vvF	BCH4	+	+
CTL F/F85–93	vvF	F85–93	+	–
CTL ΔF2/BCH4	vvF-ΔF2	BCH4	–	+
CTL F/F249–257	vvF	F249–257	–	+

*CTL lines are named indicating the virus used for priming *in vivo* and the agent used for restimulation *in vitro*, following procedures described in Methods section.

treated with 90 µg mitomycin C ml⁻¹ (Sigma). IL2 (25 U ml⁻¹) was added after 5 days. Long-term cultures were restimulated weekly with IL2 and mitomycin C-treated splenocytes and BCH4 cells at an effector:stimulator ratio of 3:1 and 5:1, respectively. The CTL F/F85-93 and CTL F/F249-257 lines were generated by stimulating 10⁷ splenocytes ml⁻¹ with 10⁻¹⁰ M of the relevant peptide. Five days after selection, IL2 (25 U ml⁻¹) was added. Long-term cultures were maintained by weekly restimulation with mitomycin C-treated 10⁻⁶ M peptide-pulsed splenocytes (effector:stimulator ratio of 3:1) and cultured in medium with IL2 and 10⁻¹⁰ M peptide. All CTL lines were cultured in minimal essential medium α supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum and 5 \times 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Standard 3–4 h ⁵¹Cr release cytotoxicity assays (Del Val *et al.*, 1988) were performed incubating CTL and target cells that had been previously labelled for 60–90 min with Na⁵¹CrO₄ at 37 °C in the presence or absence of 10⁻⁶ M peptide and washed. Down to 100-fold lower peptide concentrations gave similar results. Alternatively, P13.1 cells were infected with rVV at a m.o.i. of 3–10 p.f.u. per cell as described (Eisenlohr *et al.*, 1992), virus inoculum was thoroughly washed after 1 h adsorption, and infection was allowed to proceed for 3 h prior to cytotoxicity assay.

Intracellular cytokine staining. Intracellular cytokine staining assays were performed as described previously (Chen *et al.*, 2000). CTL lines were stimulated in the presence of 10 µg brefeldin A ml⁻¹ (Sigma) for 4 h with P13.1 target cells previously pulsed for 30 min with an excess 10⁻⁵ M peptide. Pooled splenocytes were stimulated with an excess 10⁻⁵ M peptide for up to 2 h, and stimulated for a further 3 h in the presence of brefeldin A. Following stimulation, cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD8 α (clone 53-6.7) mAb for 20 min at 4 °C, fixed with Intrastain kit (DakoCytomation) reagent A, and incubated with phycoerythrin-conjugated mAb to interferon- γ (IFN- γ) in the presence of Intrastain kit permeabilizing reagent B for 30 min at 4 °C. All antibodies were purchased from BD PharMingen. Events were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and data were analysed using CellQuest software (BD Biosciences).

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro generated CTL lines specific for the F glycoprotein of the Long strain of RSV identify F85–93 as a conserved epitope

Polyclonal F-specific CTL lines were generated *in vitro* from splenocytes obtained from BALB/c mice primed with vvF, an rVV encoding wild-type fusion glycoprotein F of RSV Long. Initially, polyclonal CTL lines were generated using procedures that kept them multispecific, that is, capable of recognizing as many F glycoprotein epitopes as possible. Thus, the CTL F/RSV line was generated by *in vitro* restimulation with RSV Long-infected splenocytes (Gaddum *et al.*, 1996). Using a novel approach the CTL F/BCH4 line was generated by stimulation with BCH4 cells. RSV Long persistently infected BCH4 cells (Fernie *et al.*, 1981) have been extensively used as targets of F-specific CTL despite their reduced synthesis of F and G viral glycoproteins (Martínez *et al.*, 2001). However, they have not been previously used as stimulators to obtain F-specific CTL lines. Functional characterization of CTL lines was carried out in cytotoxicity assays with ⁵¹Cr-labelled BCH4 cells as RSV-infected targets (Fig. 1a). Both CTL F/RSV and CTL

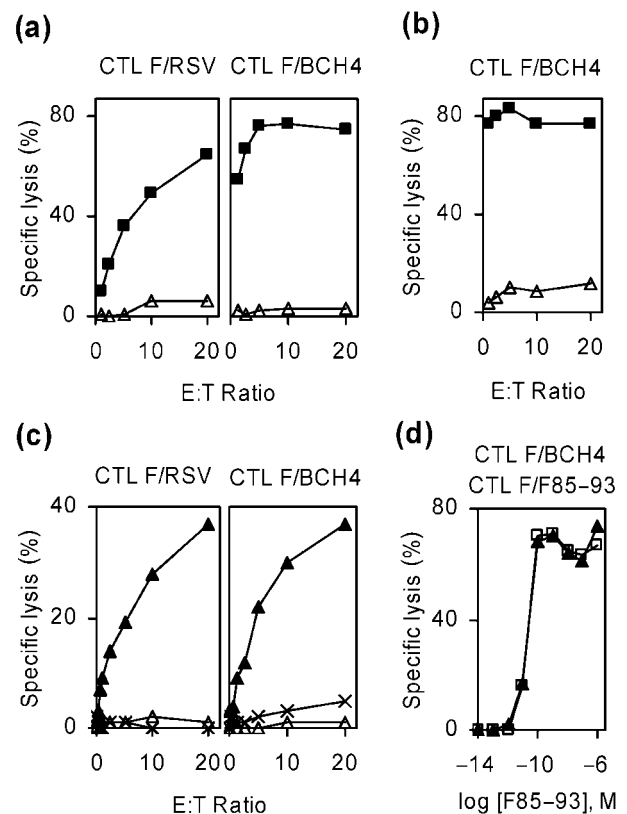


Fig. 1. *In vitro* generated CTL lines specific for the F glycoprotein of the Long strain of RSV identify F85–93 as a conserved epitope. Long-term cultures of multispecific CTL were generated from BALB/c mice infected with an rVV encoding the F protein of RSV Long (vvF). Splenocytes obtained from vvF-primed mice were stimulated with RSV-infected splenocytes (CTL F/RSV) or RSV persistently infected BCH4 cells (CTL F/BCH4). (a) CTL F/RSV and CTL F/BCH4 were used as effectors in a cytotoxicity assay, and RSV persistently infected BCH4 cells (■) or non-infected P13.1 cells (△) as targets. Percentage specific lysis calculated from ⁵¹Cr release at each E:T ratio is represented. (b) CTL F/BCH4 were used as effectors and P13.1 cells infected with vvF (■) or its parental strain WR (△) as targets. (c) Cytotoxicity assay performed with CTL F/RSV and CTL F/BCH4 as effectors and P13.1 targets pulsed with no peptide (△), F92–106 peptide (×) or F85–93 peptide (▲), corresponding to the epitopes that have been defined within the F2 chain of the A2 strain of RSV. (d) Titration cytotoxicity assay performed with P13.1 targets pulsed with increasing concentrations of F85–93 synthetic peptide at a 5:1 E:T ratio with CTL F/BCH4 (□) and CTL F/F85–93 (▲) as effectors. The latter CTL line was generated from mice infected with vvF by stimulation with F85–93 peptide. Percentage specific lysis calculated from ⁵¹Cr release obtained at different concentrations of F85–93 used to pulse targets is represented.

F/BCH4 lines were able to recognize RSV persistently infected BCH4 targets, whereas no significant lysis was observed with non-infected P13.1 targets. Poorer performance

of CTL F/RSV might reveal a suboptimal restimulation protocol. BALB/c fibroblasts (Fernie *et al.*, 1981) were not used as a negative control as, unexpectedly, no evidence was found of presentation of any synthetic peptide representing known viral epitopes to proven active CTL. Lack of recognition of wild-type vaccinia-infected cells confirmed the absence of vaccinia-specific CTL in CTL F/BCH4 that were otherwise able to efficiently detect presentation of F protein epitopes in vvF-infected cells (Fig. 1b).

F glycoprotein epitopes in A2 strain of RSV are known to be presented only by MHC class I molecule K^d (Chang *et al.*, 2001) in BALB/c mice, which express K^d, D^d and L^d. To assess if this is also true for F glycoprotein epitopes in RSV Long, cytotoxicity assays were performed with CTL F/BCH4 and vvF-infected targets transfected separately with each MHC class I molecule. Efficient presentation to active CTL was found with targets transfected with K^d but not with L^d or D^d (data not shown). Thus, as for RSV A2, in the H-2^d haplotype CTL epitopes of the fusion glycoprotein of RSV Long are only presented by K^d.

To identify epitopes presented by K^d to multispecific CTL F/RSV and CTL F/BCH4, we first assessed in cytotoxicity assays whether protein epitopes known in the A2 strain were recognized. Peptides F85–93 and F92–106 corresponding to these epitopes were synthesized and used to sensitize cells. We found that peptide F92–106 is not recognized by either CTL line (Fig. 1c) and also fails to restimulate F-primed CTL (data not shown). Despite 98 % aa identity between the F glycoproteins of RSV strains A2 and Long (López *et al.*, 1988), residues 11 and 12 of this 15-mer F92–106 epitope are not conserved (PT in A2 and AA in Long) and may be critical for the unpredictable non-canonical binding of the epitope to K^d. It cannot be excluded either that the F92–106 peptide is not a good reagent to mimic this potential epitope in the Long strain. Therefore, in RSV Long we have no evidence of the presence of this epitope.

On the other hand, both multispecific CTL F/RSV and CTL F/BCH4 lines were able to recognize F85–93 sensitized cells (Fig. 1c). Furthermore, a long-term polyclonal monospecific CTL F/F85–93 line was generated by stimulating splenocytes from vvF-primed mice with F85–93 peptide. Titration assays were performed by pulsing targets with increasing concentrations of peptide, and both multispecific CTL F/BCH4 and monospecific CTL F/F85–93 were found to recognize down to 10⁻¹¹ M F85–93 (Fig. 1d). Therefore, as expected from the conserved sequence within the epitope and flanking regions, F85–93 is also a CTL epitope in the Long strain.

Identification of CTL epitope F249–258 in the F glycoprotein of the Long strain of RSV

To identify other potential CTL epitopes in the F glycoprotein of the Long strain we constructed an rVV, vvF-ΔF2, encoding a mutant F protein in which aa 34–128 have been deleted, and which therefore does not contain the F85–93

epitope. Although the mutant was constructed in such a way as to allow maturation of the full F1 chain, reduced levels of expression compared with the wild-type protein were detected (data not shown). In spite of the lower expression of the mutant protein, cells infected with vvF-ΔF2 were efficiently lysed by CTL F/BCH4, thus demonstrating presentation of one or more undefined epitopes from vvF-ΔF2-infected cells to multispecific CTL F/BCH4 (Fig. 2a). It can be argued that a F85–93 mimotope may be recognized by F85–93-specific CTL clones present in the multispecific CTL line, or that an artificial epitope is being generated from the mutant protein. To address this issue the same targets were assayed with monospecific CTL F/F85–93 and no lysis was observed (Fig. 2a). Furthermore, a multispecific CTL ΔF2/BCH4 line that did not include F85–93-specific clones was generated from mice that had been primed with vvF-ΔF2 (see Table 1). Cytotoxicity assays were performed and as expected CTL ΔF2/BCH4 were unable to lyse targets exogenously loaded with F85–93, but were, however, able to recognize vvF-infected targets (Fig. 2b). We therefore demonstrate the existence of one or more novel uncharacterized RSV Long F glycoprotein epitopes in the F1 chain or in the first 33 aa of the protein.

In order to identify the novel epitope or epitopes, RSV Long F protein sequence was subjected to MHC class I epitope prediction programs based on motif-refined algorithms, excluding prediction of non-canonical epitopes. Programs used were SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999)

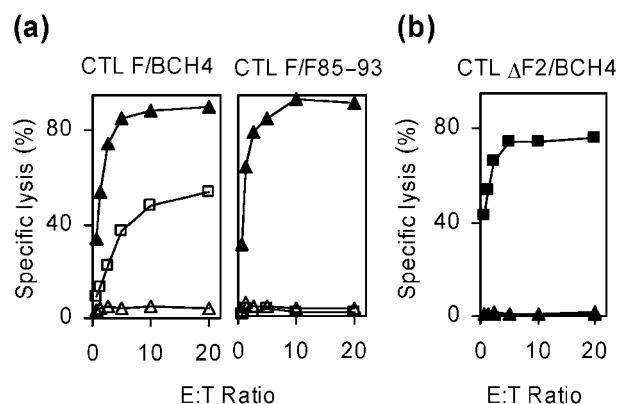


Fig. 2. Evidence of presentation of novel epitope(s) to F-specific CTL. (a) P13.1 cells were infected with vvF-ΔF2 (□), an rVV which encodes a mutant F protein in which aa 34–128 have been deleted. P13.1 cells infected with WR, in the presence (▲) or absence (△) of F85–93 peptide, were used as positive and negative controls, respectively. A cytotoxicity assay was then performed with CTL F/BCH4 and CTL F/F85–93 as effectors as indicated. (b) Cytotoxicity assay performed with CTL ΔF2/BCH4 as effectors. Long-term culture CTL ΔF2/BCH4 was obtained from vvF-ΔF2-primed mice that were stimulated with RSV persistently infected BCH4 cells. Targets were P13.1 cells infected with vvF (■), or WR in the presence (▲) or absence (△) of F85–93 peptide.

and BIMAS (Parker *et al.*, 1994). High-score putative epitopes predicted to be presented by K^d with both programs were further screened for correct C-terminal proteasomal cleavage in NetChop 2.0 Prediction Server (Keşmir *et al.*, 2002), and peptides corresponding to several predicted epitopes were synthesized. In some instances, length variants of the same region with similar scores were synthesized. We established our internal threshold by subjecting known viral K^d-restricted epitopes to each epitope prediction program. Presentation of peptides to CTL F/BCH4 was assessed in cytotoxicity assays performed with peptide-pulsed T2/K^d targets, which are deficient in transporters associated with antigen processing and thus have more peptide-receptive molecules available. Fig. 3(a) shows that targets pulsed with peptides F249–257 and F249–258 were efficiently lysed by CTL, as were F85–93 peptide-pulsed targets. Again, to control that F249–257/8 peptides were not being cross-recognized by F85–93-specific CTL clones, the same targets were confronted to CTL F/F85–93, but these were only able to recognize the F85–93 peptide (Fig. 3a, second panel). Moreover, to address the possibility of a non-specific binding to other human presenting molecules expressed by T2 targets, an assay was performed with CTL F/BCH4 and peptide-pulsed T2/L^d targets and no specific lysis was observed (Fig. 3a, third panel). These results indicate that peptides F249–257 and F249–258 are presented by K^d to specific CTL clones. As it may be argued that targets are pulsed with high concentrations of peptide (10^{-6} M), titration assays were performed to assess whether physiological concentrations of the peptides were recognized. Fig. 3(b) shows that targets pulsed with down to 10^{-10} M peptide were efficiently lysed and that the 9- and 10-mer peptides were equally recognized by CTL F/BCH4. Reciprocal CTL lysis may account for the reduced lysis observed

at high peptide concentrations. Altogether, these results demonstrate that standard concentrations of the F249–257 and F249–258 peptides can specifically activate RSV Long F protein-specific CTL.

Furthermore, a polyclonal monospecific CTL F/F249–257 line was generated from vvF-primed mice by stimulating splenocytes with F249–257 synthetic peptide. The CTL F/F249–257 line was able to recognize targets pulsed with down to 10^{-11} M peptide (Fig. 4a), and to efficiently lyse vvF and vvF-ΔF2-infected targets (Fig. 4b). For the establishment of this CTL line, different F249–257 peptide concentrations were tested in restimulation. The optimal concentration, 10^{-10} M, was exactly the same as previously found optimal by us for CTL F/F85–93 (data not shown).

Importantly, this epitope was also generated in natural RSV infection of mice, as similar polyclonal monospecific CTL RSV/F249–258 could be established (data not shown).

In contrast, neither recognition of peptide-pulsed target cells nor generation of monospecific CTL lines were observed with other predicted epitope peptides (F365–373 and F467–475, data not shown). The possibility cannot be excluded that other epitopes may exist within the deleted region, but a further predicted epitope located in the region deleted in vvF-ΔF2 represented by synthetic peptides F31–40 and F32–40 was also tested and found negative (data not shown). The results are summarized in Fig. 5.

Thus, we have identified a CTL epitope that is presented by K^d as a 9-mer (F249–257; TYMLTNSEL) or a 10-mer (F249–258; TYMLTNSELL) peptide. This epitope is located near neutralizing antibody antigenic site II (López *et al.*, 1998), and is expected to also exist in the F protein of the

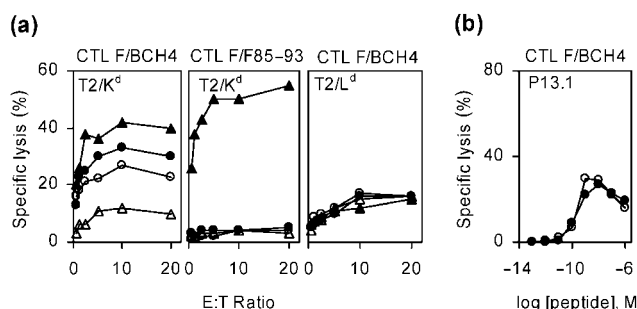


Fig. 3. Recognition by F-specific CTL of synthetic peptides F249–257 and F249–258 predicted to be epitopes presented by K^d. (a) Human T2 cells transfected with murine MHC class I molecules K^d or L^d, as indicated, were pulsed with peptides F85–93 (▲), F249–257 (●) or F249–258 (○); or not pulsed with any peptide (△). They were then tested in a cytotoxicity assay with CTL F/BCH4 and CTL F/F85–93 as effectors, as indicated. (b) Titration cytotoxicity assay performed at a 5:1 E:T ratio with CTL F/BCH4 as effectors, and P13.1 cells pulsed with increasing concentrations of synthetic peptides F249–257 (●) or F249–258 (○) as targets.

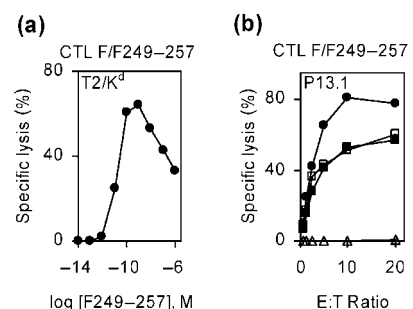


Fig. 4. Generation and properties of the F249–257 monospecific CTL line. A long-term culture of F249–257-monospecific CTL, named CTL F/F249–257, was generated from vvF-infected mice by stimulation with F249–257 synthetic peptide. (a) Titration cytotoxicity assay performed at a 5:1 E:T ratio with CTL F/F249–257 as effectors and T2/K^d cells pulsed with increasing concentrations of synthetic peptide F249–257 as targets. (b) Cytotoxicity assay performed with CTL F/F249–257 as effectors and P13.1 targets infected with vvF (■) or vvF-ΔF2 (□), or with WR in the presence (●) or absence (△) of F249–257 peptide, as positive and negative controls, respectively.

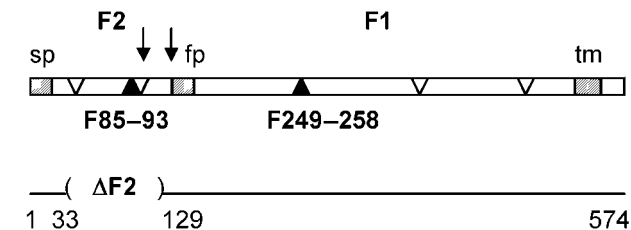


Fig. 5. CTL epitopes in F protein of RSV Long. The F glycoprotein has three hydrophobic regions corresponding to the signal peptide (sp), the fusion peptide (fp) and the transmembrane region (tm). Processing by furin-like proteases at two cleavage sites (arrows) yields the F1 and F2 chains that remain linked by a disulfide bond. CTL epitopes (▲) presented by K^d identified by us in the F protein of RSV Long are F85–93 (in the F2 chain with sequence KYKNAVTEL) and F249–258 (in the F1 chain with sequence TYMLTNSSELL). Peptides predicted to be epitopes presented by K^d but not recognized by CTL are also indicated (▽). Their sequences are F31–40, EFYQSTCSAV; F32–40, FYQSTCSAV; F92–106, ELQLLMQSTPAANNR; F365–373, VFCDTMNSL and F467–475, LYVKGEPII. The region deleted in the vvF-ΔF2 mutant is schematically indicated below with numbers marking the amino acids delimiting it.

A2 strain as its sequence and that of the flanking regions that may influence the efficiency of antigen processing and presentation (Del Val *et al.*, 1991) are also conserved in at least 35 residues on either side. However, this F249–257/8 epitope has not been identified in previous studies (Chang *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002) that used overlapping peptides in their screening. The panel of 15-mer overlapping peptides used in the identification of non-canonical A2 strain F92–106 epitope did not include any peptide in which the F249–257/8 epitope was complete (Jiang *et al.*, 2002), which explains why it was not detected. Our results demonstrate that epitope prediction programs, although unable to predict non-canonical epitopes, can be powerful tools for CTL epitope identification, as discussed recently (Nussbaum *et al.*, 2003).

Shifting immunodominance pattern of CD8⁺ T-lymphocyte responses to F85–93 and F249–258 after *in vivo* vvF infection and in CTL lines

A potential competition between the two epitopes presented by K^d and located in the F protein of RSV Long (F85–93 and F249–257/8) led us to examine the hierarchy of CD8⁺ T-lymphocyte responses. Factors that potentially contribute to immunodominance include efficiency of antigen processing, binding affinity of peptides to class I molecules, presence of T lymphocytes capable of responding to a given peptide/MHC complex and inhibition of responses to subdominant epitopes by CD8⁺ T lymphocytes specific for dominant epitopes (Chen *et al.*, 2000; Yewdell & Bennink, 1999). The fact that recognition of peptide F249–257 by monospecific CTL F/F249–257 was better than

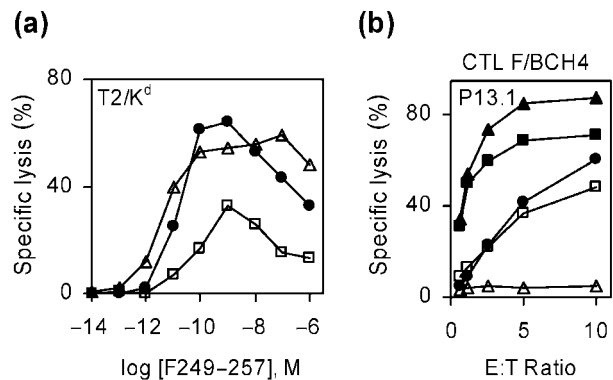


Fig. 6. Differential recognition of peptides F85–93 and F249–257 by CTL lines. (a) T2/K^d cells were pulsed with increasing concentrations of peptide F249–257, and a titration cytotoxicity assay was performed at a 5:1 E:T ratio using CTL ΔF2/BCH4 (Δ), CTL F/F249–257 (●) and multispecific CTL F/BCH4 (□) as effectors (see Table 1). (b) Cytotoxicity assay performed with CTL F/BCH4 effectors and P13.1 targets infected with vvF (■) or vvF-ΔF2 (□); or with WR in the presence of F85–93 (▲) or F249–257 (●) peptides as positive controls; or with WR (Δ) as a negative control.

by CTL F/BCH4 (Figs 4a and 3b, respectively), suggested that F249–257 might be a subdominant determinant in the latter multispecific CTL line. Furthermore, when T lymphocyte clones specific for the immunodominant F85–93 epitope were not present in the CTL line, as in CTL ΔF2/BCH4 or in CTL F/F249–257 (see Table 1), targets pulsed with down to 10⁻¹¹ M F249–257 peptide were efficiently lysed (Fig. 6a). Therefore, the limit in F249–257 peptide recognition by CTL F/BCH4 is imposed by F85–93-specific T lymphocyte clones, not by BCH4 cells, as these are able to select more sensitive CTL when stimulating splenocytes from vvF-ΔF2-primed mice.

Further evidence of the decreased sensitivity in epitope recognition of F249–257/8-specific CTL clones present in CTL F/BCH4 came from the different recognition pattern observed at low effector to target (E:T) ratios in a cytotoxicity assay performed with multispecific CTL F/BCH4 and infected targets (Fig. 6b). At an E:T ratio of 1:1, 50% or more specific lysis was only reached with targets presenting the F85–93 immunodominant epitope, with both peptide-pulsed and vvF-infected cells. Differences in recognition did not result from differences in efficiency of antigen presentation from vvF and vvF-ΔF2, as Fig. 4(b) shows that both rVV were able to equally present the subdominant determinant to CTL F/F249–257, a CTL line devoid of F85–93-specific T lymphocyte clonotypes. In fact, recognition of vvF by CTL F/BCH4 (Fig. 6b) is higher than by CTL F/F249–257 (Fig. 4b). This is not unexpected, as recognition of more epitopes by the former multispecific line than by the latter monospecific line (see Table 1) can easily account for this.

To assess whether responses to the immunodominant determinant F85–93 were preventing the emergence of responses to the subdominant determinant F249–257/8, we quantified CD8⁺ T lymphocytes specific for each epitope in an intracellular cytokine staining assay using peptide-pulsed cells to stimulate CTL F/BCH4 and CTL ΔF2/BCH4. Fig. 7(a) (upper panels) shows that when targets were pulsed with peptide F85–93, 77 % of the CD8⁺ lymphocytes in the CTL F/BCH4 line were activated to produce IFN-γ, whereas only 9.8 and 9.4 % of the CD8⁺ lymphocytes were activated by peptides F249–257 and F249–258, respectively. Therefore CTL lines obtained from vvF-primed memory mice show immunodominance, as CTL responses are strongly skewed to F85–93 at the expense of responses to F249–257/8. Interestingly, when the immunodominant epitope F85–93 was absent in the *in vivo* priming event that led to the generation of the CTL ΔF2/BCH4 line, 98 and 52 % activation was achieved by stimulation with peptides F249–258 and F249–257, respectively, showing that in the absence of the F85–93 epitope, responses to the F249–257/8 epitope are very efficiently generated. Thus, there is no limitation in the *in vivo* availability of CD8⁺ T lymphocytes capable of responding to F249–257/8.

In addition, as 98 % of CD8⁺ T lymphocytes in CTL ΔF2/BCH4 responded to F249–258 10-mer peptide, we suggest that no other epitope is recognized by this CTL line. Concerning endogenous antigen processing of the F glycoprotein in BCH4 cells, the fact that 10-mer F249–258 is recognized by all CTL in the CTL ΔF2/BCH4 line strongly suggests that the 10-mer is probably a naturally produced K^d ligand in BCH4 cells.

Hierarchy in primary, memory and secondary CD8⁺ T-lymphocyte responses to F85–93, F249–257 and F249–258 was studied *in vivo* after vvF infection (Fig. 7b). CD8⁺ lymphocytes activated with each peptide in an intracellular cytokine staining assay are observed with a frequency similar to that reported in other systems (Chen *et al.*, 2000). Staining with tetramers K^d/F85–93 and K^d/F249–258 essentially gave the same results (data not shown). Low frequencies are probably due to competition with vaccinia virus determinants, which for example have previously been suggested to account for difficulty in detection of the NP_{147–155} epitope following infection with an rVV encoding the complete influenza virus nucleoprotein, NP (Chen *et al.*, 2000; Restifo *et al.*, 1995). This has been discussed in terms

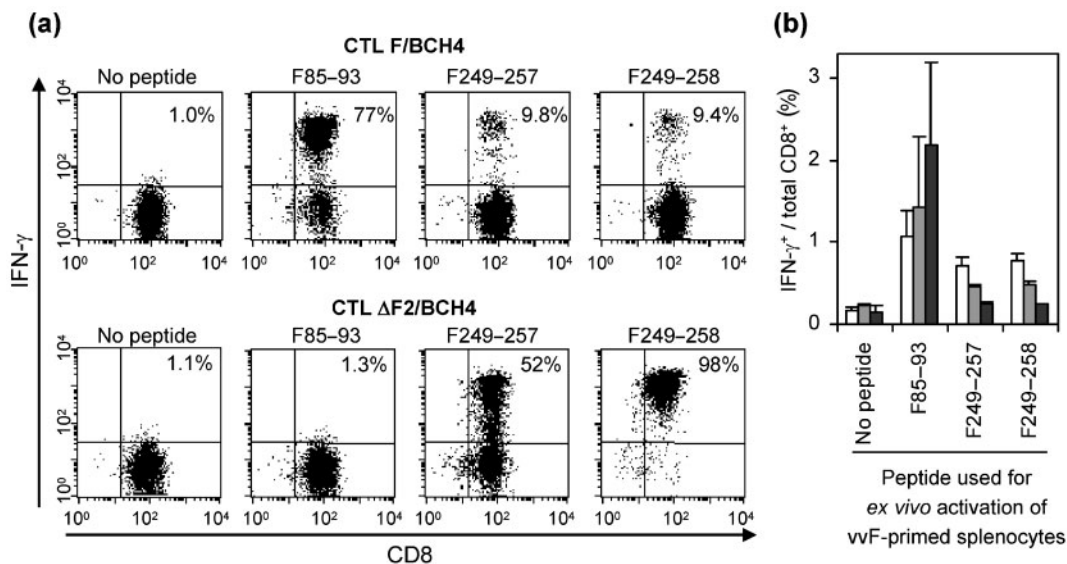


Fig. 7. Populations of CD8⁺ T lymphocytes responsive to F85–93 and F249–257/8 in CTL lines (a) and after vvF infection *in vivo* (b). Intracellular cytokine staining assays were performed by stimulating CTL or splenocytes with synthetic peptides, as indicated, in the presence of brefeldin A to intracellularly accumulate IFN-γ produced upon activation of CTL by interaction with peptide presented by K^d. Cells were stained with anti-CD8, fixed, permeabilized and stained for cytoplasmic IFN-γ. (a) Long-term CTL cultures CTL F/BCH4 (top panels) and CTL ΔF2/BCH4 (lower panels) were stimulated with the indicated peptides. Percentages of total CD8⁺ lymphocytes that stained for IFN-γ are shown in the upper right quadrant of each dot plot. Over 8000 CD8⁺ cells were analysed in each sample. (b) Splenocytes were obtained from mice 7 days post-infection with 10⁷ p.f.u. vvF to study the primary response (white bars; data are the mean of seven mice from four independent experiments). The memory response was assessed in mice that received a booster of vvF 3 weeks later, and then were left resting for several months (grey bars; data are the mean of two mice from two independent experiments). The secondary response was studied in animals of the memory response group 7 days after a third dose of vvF (black bars; data are the mean of two mice from two independent experiments). Percentage of total CD8⁺ lymphocytes that stained for IFN-γ after activation with each peptide is represented. A mean of 50 000 CD8⁺ cells were analysed in each sample.

of the limitations of viral vectors that elicit massive CTL responses to their own antigens.

In the primary immune response to vvF (Fig. 7b, white bars), there is no limitation for the generation of a similarly effective CD8⁺ T-lymphocyte response to either epitope, as frequencies are comparable after stimulation with either peptide, thus concluding that no significant hierarchy exists in the *in vivo* primary response in vvF-infected mice. However, frequencies of epitope-specific populations in the memory immune response (Fig. 7b, grey bars) increase for F85–93 and decrease for F249–257/8 in comparison with the primary immune response (Fig. 7b, white bars). Therefore, in the initial experimental setting for *in vitro* selection of CTL lines by restimulation with BCH4 cells, the F85–93-specific CD8⁺ T lymphocyte population is already in advantage. This difference is probably amplified by restimulation with BCH4 cells to that observed in the CTL F/BCH4 line (Fig. 7a).

Furthermore, in a secondary immune response (Fig. 7b, black bars) the mean percentage of activated CD8⁺ lymphocytes after stimulation with peptide F85–93 is almost 10-fold higher than after stimulation with peptides F249–257 or F249–258. This difference in the number of F85–93 and F249–257/8 epitope-specific CD8⁺ T lymphocytes is similar in proportion to that observed in the established *in vitro* generated CTL F/BCH4 line (Fig. 7a). Therefore, the CTL F/BCH4 line is representative of an *in vivo* secondary response to vvF infection.

Different patterns of T cell immunodominance in primary and secondary responses have been described previously (Belz *et al.*, 2000; Crowe *et al.*, 2003). In influenza virus primary infection, similar frequencies of T cells specific for epitopes D^bPA₂₂₄ and D^bNP₃₆₆ are observed, whereas the secondary response is dominated by T cells specific for D^bNP₃₆₆ (Belz *et al.*, 2000). The mechanism underlying this changing pattern of immunodominance has been investigated in a recent study that proposes a model in which differential antigen presentation by dendritic and non-dendritic cells together with the capacity of T cells to perceive the antigens presented by these cells, regulate the T cell specificity pattern (Crowe *et al.*, 2003). Along with this hypothesis, we suggest that in our experimental system professional antigen presenting cells with a similar proportion of epitopes F85–93 and F249–258 would activate naïve T cells during the primary immune response, whereas during the secondary immune response memory T cells would also be activated by cross-priming or by non-professional antigen presenting cells with a higher proportion of epitope F85–93. This would lead to the gradual establishment of a CD8⁺ T-lymphocyte response strongly skewed to epitope F85–93.

The different immunodominance pattern for epitopes F85–93 and F249–258 observed in primary and secondary vvF infection must be taken into account when considering single epitope vaccines. However, the finding that CD8⁺ T

lymphocytes specific for either epitope are generated *in vivo* holds promise for the potential to generate a multispecific CD8⁺ response in natural infection or after vaccination. In conjunction with neutralizing antibodies targeting the F protein, a multispecific CD8⁺ response would better contribute to clearing RSV infection, as it would hinder the emergence of viral CTL escape mutants lacking single determinants. Definition of novel CTL epitopes thus contributes to addressing these issues in the mouse model.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs H.-G. Rammensee (Tübingen University, Tübingen, Germany), G. Hämmerling (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany) and G. Taylor (Institute for Animal Health, Compton, UK) for cell lines; and Rafael Blasco (INIA, Madrid, Spain) for pRB21 plasmid and vRB12 vaccinia virus. Recombinant human IL2 was a gift of Hoffmann-La Roche (Nutley, NJ). We are grateful to Dr J. A. López for help in initial stages of construction of rVV. Technical assistance of F. Vélez and C. Mir is gratefully acknowledged. This work was supported by grants PM99-0022 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, 08.2/0004/2000.1 from Comunidad de Madrid, and 01/33 from Instituto de Salud Carlos III to M.D.V. and 01/24 from Instituto de Salud Carlos III to J.A.M. C.J. is the holder of a grant from Ministerio de Ciencia y Tecnología, P.L. and F.M. were supported by Comunidad de Madrid and the European Union.

REFERENCES

- Belz, G. T., Xie, W., Altman, J. D. & Doherty, P. C. (2000). A previously unrecognized H-2D^b-restricted peptide prominent in the primary influenza A virus-specific CD8⁺ T-cell response is much less apparent following secondary challenge. *J Virol* **74**, 3486–3493.
- Bembridge, G. P., López, J. A., Cook, R., Melero, J. A. & Taylor, G. (1998). Recombinant vaccinia virus coexpressing the F protein of respiratory syncytial virus (RSV) and interleukin-4 (IL-4) does not inhibit the development of RSV-specific memory cytotoxic T lymphocytes, whereas priming is diminished in the presence of high levels of IL-2 or gamma interferon. *J Virol* **72**, 4080–4087.
- Bembridge, G. P., Rodríguez, N., García-Beato, R., Nicolson, C., Melero, J. A. & Taylor, G. (2000). DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J Gen Virol* **81**, 2519–2523.
- Blasco, R. & Moss, B. (1995). Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* **158**, 157–162.
- Cannon, M. J., Openshaw, P. J. & Askonas, B. A. (1988). Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med* **168**, 1163–1168.
- Carbone, F. R. & Bevan, M. J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen *in vivo*. *J Exp Med* **171**, 377–387.
- Chang, J. & Braciale, T. J. (2002). Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8⁺ T-cell effector activity and peripheral CD8⁺ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med* **8**, 54–60.
- Chang, J., Srikiatkachorn, A. & Braciale, T. J. (2001). Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8⁺ T cells during experimental virus infection. *J Immunol* **167**, 4254–4260.

- Chen, W., Antón, L. C., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2000). Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* **12**, 83–93.
- Collins, P. L., Chanock, R. M. & Murphy, B. R. (2001). Respiratory syncytial virus. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1443–1485. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Cristina, J., López, J. A., Albo, C., García-Barreno, B., García, J., Melero, J. A. & Portela, A. (1990). Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* **174**, 126–134.
- Crowe, S. R., Turner, S. J., Miller, S. C., Roberts, A. D., Rappolo, R. A., Doherty, P. C., Ely, K. H. & Woodland, D. L. (2003). Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8⁺ T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *J Exp Med* **198**, 399–410.
- Del Val, M., Volkmer, H., Rothbard, J. B., Jonjić, S., Messerle, M., Schickedanz, J., Reddehase, M. J. & Koszinowski, U. H. (1988). Molecular basis for cytolytic T-lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus immediate-early protein pp89. *J Virol* **62**, 3965–3972.
- Del Val, M., Schlicht, H. J., Ruppert, T., Reddehase, M. J. & Koszinowski, U. H. (1991). Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* **66**, 1145–1153.
- Eisenlohr, L. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (1992). Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **175**, 481–487.
- Fernie, B. F., Ford, E. C. & Gerin, J. L. (1981). The development of Balb/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on the cell surface. *Proc Soc Exp Biol Med* **167**, 83–86.
- Gaddum, R. M., Cook, R. S., Wyld, S. G., López, J. A., Bustos, R., Melero, J. A. & Taylor, G. (1996). Mutant forms of the F protein of human respiratory syncytial (RS) virus induce a cytotoxic T lymphocyte response but not a neutralizing antibody response and only transient resistance to RS virus infection. *J Gen Virol* **77**, 1239–1248.
- García-Barreno, B., Jorcano, J. L., Aukenbauer, T., López-Galíndez, C. & Melero, J. A. (1988). Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus (RSV). *Virus Res* **9**, 307–321.
- García-Barreno, B., Palomo, C., Peñas, C., Delgado, T., Pérez-Breña, P. & Melero, J. A. (1989). Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol* **63**, 925–932.
- González-Reyes, L., Ruiz-Argüello, M. B., García-Barreno, B., Calder, L., López, J. A., Albar, J. P., Skehel, J. J., Wiley, D. C. & Melero, J. A. (2001). Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9859–9864.
- Graham, B. S., Bunton, L. A., Wright, P. F. & Karzon, D. T. (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* **88**, 1026–1033.
- Jiang, S., Borthwick, N. J., Morrison, P., Gao, G. F. & Steward, M. W. (2002). Virus-specific CTL responses induced by an H-2K^d-restricted, motif-negative 15-mer peptide from the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **83**, 429–438.
- Keşmir, C., Nussbaum, A. K., Schild, H., Detours, V. & Brunak, S. (2002). Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng* **15**, 287–296.
- Kulkarni, A. B., Collins, P. L., Bacik, I., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., Crowe, J. E., Jr & Murphy, B. R. (1995). Cytotoxic T cells specific for a single peptide on the M2 protein of respiratory syncytial virus are the sole mediators of resistance induced by immunization with M2 encoded by a recombinant vaccinia virus. *J Virol* **69**, 1261–1264.
- Li, X., Sambhara, S., Li, C. X. & 7 other authors (1998). Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J Exp Med* **188**, 681–688.
- López, J. A., Villanueva, N., Melero, J. A. & Portela, A. (1988). Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res* **10**, 249–261.
- López, J. A., Bustos, R., Örvell, C., Berois, M., Arbiza, J., García-Barreno, B. & Melero, J. A. (1998). Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol* **72**, 6922–6928.
- Martínez, I., Bustos, J. & Melero, J. A. (2001). Reduced expression of surface glycoproteins in mouse fibroblasts persistently infected with human respiratory syncytial virus (HRSV). *Arch Virol* **146**, 669–683.
- Nussbaum, A. K., Kuttler, C., Tenzer, S. & Schild, H. (2003). Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes. *Curr Opin Immunol* **15**, 69–74.
- Olmsted, R. A., Elango, N., Prince, G. A., Murphy, B. R., Johnson, P. R., Moss, B., Chanock, R. M. & Collins, P. L. (1986). Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7462–7466.
- Parker, K. C., Bednarek, M. A. & Coligan, J. E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* **152**, 163–175.
- Pemberton, R. M., Cannon, M. J., Openshaw, P. J., Ball, L. A., Wertz, G. W. & Askonas, B. A. (1987). Cytotoxic T cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: fusion protein is an important target antigen. *J Gen Virol* **68**, 2177–2182.
- Rammensee, H. G., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213–219.
- Restifo, N. P., Bačik, I., Irvine, K. R., Yewdell, J. W., McCabe, B. J., Anderson, R. W., Eisenlohr, L. C., Rosenberg, S. A. & Bennink, J. R. (1995). Antigen processing *in vivo* and the elicitation of primary CTL responses. *J Immunol* **154**, 4414–4422.
- Schlender, J., Zimmer, G., Herler, G. & Conzelmann, K. K. (2003). Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* **77**, 4609–4616.
- Simoës, E. A. (1999). Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* **354**, 847–852.
- Srikiatkachorn, A. & Braciale, T. J. (1997). Virus-specific CD8⁺ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med* **186**, 421–432.
- Stott, E. J., Taylor, G., Ball, L. A., Anderson, K., Young, K. K., King, A. M. & Wertz, G. W. (1987). Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J Virol* **61**, 3855–3861.
- Taylor, G., Stott, E. J., Bew, M., Fernie, B. F., Cote, P. J., Collins, A. P., Hughes, M. & Jebbett, J. (1984). Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology* **52**, 137–142.
- The Impact-RSV Study Group (1998). Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* **102**, 531–537.

Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* **17**, 51–88.

Zhou, X., Momburg, F., Liu, T., Abdel Motal, U. M., Jondal, M., Hämmerling, G. J. & Ljunggren, H. G. (1994). Presentation of viral

antigens restricted by H-2K^b, D^b or K^d in proteasome subunit LMP2- and LMP7-deficient cells. *Eur J Immunol* **24**, 1863–1868.

Zimmer, G., Budz, L. & Herrler, G. (2001). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* **276**, 31642–31650.

Multiple TAP-dependent and -independent antigen processing pathways for RSV F protein CTL epitopes

Carolina Johnstone¹, Sara Guil¹, Miguel A. Rico², Daniel López², Blanca García-Barreno³, José A. Melero³ and Margarita Del Val^{1*}

Unidades de Inmunología Viral¹, Proteómica² and Biología Viral³, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Pozuelo km 2, E-28220 Majadahonda (Madrid), Spain

**Corresponding author: Margarita del Val, Unidad de Inmunología Viral, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Pozuelo km 2, E-28220 Majadahonda (Madrid), Spain. Phone: +34 915 097 943. Fax: +34 915 097 919. E-mail: mdval@isciii.es.*

Running Title: Presentation pathways for RSV F CTL epitopes

Key words: Antigen Presentation/Processing, CTL, Epitope, Viral, MHC.

Total character count: 68331

ABSTRACT

We have studied in different viral contexts the processing and presentation of respiratory syncytial virus (RSV) fusion (F) protein epitopes F85-93 and F249-258 presented by the murine MHC class I molecule K^d. We have found major differences in presentation pathways depending on the epitope, the form and viral context of the antigen. Epitope F85-93 is presented through an endogenous pathway dependent on the transporters associated with antigen processing (TAP) when the F protein is in either RSV or recombinant vaccinia virus (rVV) context. The proteasome mediates this pathway in cells infected with rVV encoding either native, cytosolic, or a form of the F protein retained before the *mid*-Golgi. An additional endogenous TAP-independent presentation pathway is found for F85-93 in cells infected with a rVV encoding native F protein. In contrast, epitope F249-258 is presented through a TAP-independent pathway when the F protein is expressed from RSV or rVV, and presentation is endogenous or mostly exogenous, respectively. Therefore, different TAP-dependent and independent pathways are accessible to individual epitopes presented by the same MHC class I molecule and processed from the same protein in different viral contexts, underscoring the diversity of pathways available for presentation of epitopes to CTL.

INTRODUCTION

CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) are able to specifically recognise and eliminate virus-infected cells. Recognition takes place through a specific interaction between a T cell receptor (TCR) of the CTL and a MHC class I molecule presenting a viral peptide on the surface of the virus-infected cell. In general, peptides presented on MHC class I molecules are 8-10 residues long, and derive from products of the processing of intracellular viral proteins by the proteasome multicatalytic complex in the cytosol. Correct carboxy termini must be generated by endoproteases such as the proteasome and maybe TPPII (1), as carboxypeptidase activity is limited in this classical antigen processing pathway (2). Peptides of 8-16 residues, that survive extensive cytosolic peptidase activity (1,3), are efficiently translocated by the transporters associated with antigen processing (TAP) to the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), where amino termini residues can be further trimmed by ER aminopeptidases ERAAP/ERAP (4-7). Of all ER peptides, only a small number is selected by their affinity to the peptide binding groove of nascent MHC class I heavy chains. Chaperones assist in the assembly of a stable heterotrimeric complex formed by the nascent MHC class I heavy chain, β_2 -microglobulin and the peptide. The assembled MHC/peptide complex then exits the ER and is transported through the Golgi to the cell surface by the constitutive secretory route.

Alternative antigen processing and presentation pathways have been described. For instance, in TAP-deficient cells, different routes have been reported that are able to deliver peptides to receptive MHC class I molecules for their presentation to CTL. The mechanism by which these peptides are processed and presented independently of TAP include liberation of leader peptides by signal peptidase in the ER (8,9), liberation of epitopes belonging to proteins associated or not to membranes by undefined endoproteases in the ER (10-13), or release of peptides from proteins that mature by furin in the *trans*-Golgi network (TGN) (14,15). Entry to the ER by unknown mechanisms has also been reported for plasmid or virus encoded peptides (11,16-18). Furthermore, although peptides presented on MHC class I molecules are usually processed from endogenous antigens, peptides processed from exogenous antigens can also be presented. TAP-independent loading of endogenous or exogenous antigen derived peptides onto recycling MHC class I molecules can occur in endolysosomal acidic compartments (19,20).

TAP-independent presentation has been reported for the F protein of measles virus (19), the N nucleocapsid proteins of measles virus and canine distemper virus (21), and the NP nucleoprotein of Sendai virus (22); all members of the *Paramyxoviridae* family to which respiratory syncytial virus (RSV) belongs. In this study we assess processing and presentation of RSV F protein epitopes F85-93 and F249-258 presented by the murine MHC class I molecule K^d. Human RSV F glycoprotein is a type I integral membrane protein synthesised as a signal-sequence containing precursor, F0, that is cleaved at residues 109 and 136 by furin-like proteases (23,24). Cleavage yields two subunits, F1 and F2, that remain linked by a disulfide bond. Epitope F85-93 (25) is located in the smaller amino-terminal F2 subunit whereas epitope F249-258 (26) is located in the larger carboxy-terminal F1 subunit hosting the fusion peptide, the transmembrane region and several neutralizing antibody antigenic sites (27). Conformational changes induced by cleavage allow the insertion of the hydrophobic fusion peptide (amino termini of the F1 subunit) into the target membrane during virus-mediated fusion. Thus, furin cleavage at site I and II is necessary for the virus to become fusion active (23,24).

We have studied in different viral contexts the processing and presentation of RSV F protein epitopes F85-93 and F249-258, and we have found major differences in presentation pathways depending on the epitope and on the viral context of the antigen. Epitope F85-93 is presented through an endogenous pathway dependent on TAP when the F protein is in either RSV or recombinant vaccinia virus (rVV) viral context. However, in rVV-infected cells an additional endogenous TAP-independent presentation pathway is functioning for epitope F85-93. In contrast epitope F249-258 is presented through a TAP-independent pathway when the F protein is expressed from RSV or rVV, but presentation is endogenous or mostly exogenous, respectively. Our results underscore the diversity of pathways available for presentation of epitopes to CTL.

RESULTS

In RSV-infected cells, endogenous presentation pathways for epitopes F85-93 and F249-258 are TAP-dependent or -independent, respectively.

In order to study processing and presentation of the F protein of RSV, we initially sought to assess TAP-independent presentation, as it has been reported for other paramyxovirus proteins (19,21,22). Therefore, human T2/K^d cells deficient in TAP and transfected with murine MHC class I molecule K^d were infected with RSV. Intracellular cytokine staining (ICS) assays were performed with CTL F/F85-93 and CTL F/F249-258, which are monospecific for epitopes F85-93 and F249-258, respectively. To control background activation of CTL we performed a time 0 h infection with RSV as well as a mock infection with medium. Figure 1A (left panels) shows CTL F/F249-258 were activated by TAP-deficient targets infected with RSV at the highest possible multiplicity of infection (m.o.i) and for long periods of time. Thus, we conclude epitope F249-258 is presented through a TAP-independent pathway when the F protein is in its natural viral context. In contrast epitope F85-93 is not presented independently of TAP.

To assess the nature of presentation, infections were also carried out in the presence of brefeldin A (BFA), a metabolite that specifically blocks anterograde transport in the endogenous secretory pathway (28). Activation of CTL F/F249-258 was inhibited when ICS were performed with targets infected for 16 h with RSV in the presence of BFA (Figure 1A, left panels). Inhibition was specific as BFA did not affect presentation of low concentrations of synthetic peptides (data not shown). Therefore we conclude that TAP-independent presentation of epitope F249-258 from RSV F protein is endogenous.

In order to assess TAP-dependent processing, T2/K^d/TAP cells (T2/K^d cells transfected with TAP) were infected with RSV and ICS assays were performed with CTL F/F85-93 and CTL F/F249-258 (Figure 1B, right panels). Activation of both CTL lines was observed indicating epitope F85-93 is presented through a TAP-dependent pathway when the F protein is in its natural viral context. In addition, CTL F/F249-258 were activated more strongly than with TAP-deficient cells, and at lower m.o.i., suggesting but not demonstrating the existence of also a TAP-dependent pathway of presentation for epitope F249-258. Presentation was endogenous as activation of CTL F/F85-93 and CTL F/F249-258 was inhibited when infections were carried out in

the presence of BFA during the longest time possible without BFA being toxic for the cells (Figure 1B, right panels). BFA did not affect the presentation of low concentrations of synthetic peptides (data not shown). Therefore we conclude that when epitopes are processed from the F protein in its natural viral context, RSV, presentation pathways are endogenous, dependent on TAP for epitope F85-93 and TAP-independent for epitope F249-258.

When the F protein is inserted in a rVV, both epitopes, F85-93 and F249-258, are presented independently of TAP but follow different pathways.

RSV resulted limited for the study of antigen processing *in vitro* as it required long infection times that did not allow us to perform infections with antigen processing inhibitors other than BFA. For example, proteasome-specific inhibitor lactacystin (LC) (29) resulted toxic under these conditions (data not shown). Furthermore, the fact that a recombinant RSV lacking the F protein is not viable did not allow us to properly control the background. Therefore in order to further study the processing and presentation of epitopes F85-93 and F249-258, it became necessary to change the viral context of the antigen. When ICS assays were performed with TAP-deficient T2/K^d targets infected with a rVV encoding the wild type sequence of human RSV F protein (vvF, schematically depicted in Figure 2), CTL F/F85-93 and CTL F/F249-258 were both activated (Figure 3A). These results allow us to conclude that in the case of a rVV encoded F protein, both epitopes, F85-93 and F249-258, can be processed independently of TAP, in contrast to sole F249-258 TAP-independent presentation in RSV-infected targets. Therefore by introducing the F protein in a different viral context a new TAP-independent pathway is available for presentation of epitope F85-93.

As an additional control, T2/K^d targets were infected with rVV vvFsig⁻ encoding a cytosolic F protein in which the signal sequence has been deleted (Figure 2). In general, membrane or secretory proteins have an N-terminal signal sequence that allows cotranslational translocation to the ER through the translocon, and that is cleaved by the signal peptidase enzyme in the ER. Thus, the rule is that proteins without a signal sequence will not be able to access the constitutive endogenous secretory route. Accordingly, TAP-deficient T2 cells have never presented epitopes from cytosolic proteins while doing so from their secretory counterparts ((14,15), and unpublished results). However, when CTL were cocultured with TAP-deficient targets expressing the cytosolic form of the F protein, CTL F/F85-93 and CTL F/F249-258

behaved differently. As expected, absence of activation of CTL F/F85-93 by vvFsig⁻-infected T2/K^d targets strongly suggests epitope F85-93 is being processed and presented through a TAP-independent pathway following the endogenous secretory route inaccessible to the cytosolic F protein. In contrast, activation of CTL F/F249-258 by the same targets indicates epitope F249-258 is able to be processed and presented by a distinct TAP-independent pathway that can be accessed by the cytosol-confined Fsig⁻ protein.

The F protein lacking a signal sequence is known to be degraded rapidly within infected cells, accordingly, it is barely detected by immunofluorescence (30). Precursor or final peptides derived from processing of the cytosolic F protein might be transported to the ER by TAP-independent mechanisms. To control no leakiness existed for peptides in our TAP-deficient experimental setting, T2/K^d cells were infected with rVV encoding a cytosolic or secretory minigene of an influenza virus nucleoprotein epitope presented by K^d. As expected, activation of the corresponding specific CTL with TAP-deficient T2/K^d cells was only achieved after expression of the secretory epitope, while TAP competent cells also activated CTL when expressing the cytosolic epitope (Figure 3B). We must therefore conclude that T2/K^d cells are not leaky, and consider the possibility that the cytosolic F protein or derived products may enter vesicular compartments by a signal sequence and TAP-independent mechanism, gaining access to a compartment proficient in processing the F249-258 epitope.

To study the endogenous or exogenous nature of the TAP-independent presentation of epitopes F85-93 and F249-258, infections were performed with or without BFA, and again CTL F/F85-93 and CTL F/F249-258 behaved differently in ICS assays (Figure 3C). TAP-independent presentation of epitope F85-93 from wild type F protein encoded in rVV was endogenous as 100% specific inhibition by BFA was observed. This is not the case for TAP-independent presentation of epitope F249-258 from wild type or cytosolic F proteins encoded in rVV, for which less than 50% specific inhibition by BFA was achieved indicating a strong exogenous component in presentation. Presentation of low concentrations of synthetic peptides in presence of BFA was controlled (data not shown). Absence of a complete resistance to BFA by epitope F249-258 may indicate the existence of an additional endogenous TAP-independent F249-258 presentation pathway, as described above for RSV-infected targets.

We therefore conclude that when the F protein is encoded in rVV, epitopes under study are processed and presented differently in the absence of TAP, each following distinct TAP-independent antigen processing and presentation pathways. Epitope F85-93 follows a TAP-independent endogenous (BFA^S) pathway, whereas epitope F249-258 is processed through a TAP-independent exogenous (BFA^R) pathway accessible to a cytosolic F protein encoded in rVV. These striking results are in contrast with the absence of a TAP-independent F85-93 presentation pathway, and with the endogenous nature of the TAP-independent presentation of F249-258 in RSV-infected cells.

rVV-expressed epitope F85-93 is also processed by the proteasome in a TAP-dependent pathway, unlike epitope F249-258.

Since presentation of epitope F85-93 is dependent on TAP when the F protein is in its natural viral context, TAP-dependent pathways were further assessed in rVV-infected cells. T2/K^d/TAP cells were infected with vvF or vvFsig⁻, and ICS assays were performed with CTL F/F85-93 or CTL F/F249-258. In rVV-infected cells epitope F85-93 can also be processed through a pathway that is dependent on TAP, as CTL F/F85-93, which were not activated by TAP-deficient targets expressing the cytosolic F protein (Figure 3A), were now activated (Figure 4A). Moreover, the increase in activation of CTL F/F85-93 by vvF-infected T2/K^d/TAP targets compared to vvF-infected T2/K^d targets indicates TAP-dependent pathways are significantly contributing, together with TAP-independent pathways, to the overall presentation of epitope F85-93. These differences were not observed for CTL F/F249-258 (compare Figures 3A and 4A). In addition, the strength of the cytosolic confinement of the Fsig⁻ protein as well as the integrity of the F85-93 epitope in this protein is controlled.

Dependence on an intact secretory pathway was again assessed through BFA, controlling presentation of low concentrations of synthetic peptides (data not shown). Infection of T2/K^d/TAP with vvF or vvFsig⁻ in presence of BFA demonstrates TAP-dependent presentation of epitope F85-93 was endogenous, as total specific inhibition was achieved (Figure 4B). Presentation of epitope F249-258 from the wild type or cytosolic F protein in T2/K^d/TAP cells was again not fully susceptible to BFA. Specific inhibition was slightly higher than that observed in TAP-deficient T2/K^d cells, suggesting, but not demonstrating, the existence of an endogenous TAP-dependent pathway also for epitope F249-258.

To investigate proteasome dependence of the presentation of RSV F epitopes, experiments were carried out with proteasome-specific inhibitor LC. T2/K^d/TAP cells were infected with vvF or vvFsig⁻ in the presence of LC, and ICS assays were performed with CTL F/F85-93 or CTL F/F249-258 (Figure 4C). Again, we observed a different behaviour for each CTL line. LC had no effect on activation of CTL F/F249-258. Thus, we have no evidence supporting the processing of epitope F249-258 through a proteasome dependent pathway. In contrast, activation of CTL F/F85-93 was highly inhibited by LC. Thereby, we can conclude epitope F85-93 can be presented through the classical TAP-dependent pathway that involves degradation by the proteasome.

Characterising TAP-independent endogenous presentation of F85-93 in vvF-infected cells

We have shown that when the F protein is encoded in rVV, presentation of epitope F85-93 in TAP-competent cells is contributed by two different endogenous (BFA^S) pathways, the classical presentation pathway mediated by the proteasome and a vaccinia-virus-specific TAP-independent endogenous pathway. To further characterise the latter pathway, T2/K^d targets were infected with vvF in the presence of LC and ICS assays were performed with CTL F/F85-93 (Figure 5A). Presentation of low concentrations of synthetic peptides in presence of LC was controlled (data not shown). LC had no effect on activation of CTL F/F85-93, as expected, demonstrating proteasomal products of the F protein are not involved in the endogenous TAP-independent presentation of epitope F85-93. In addition, this result controlled the absence of leakiness of proteasomal precursor peptides in our TAP-deficient cells.

TAP-independent presentation of epitope F85-93 was further studied by infecting T2/K^d cells with VAFS2 (Figure 5B, left panels), a rVV encoding a F protein with a mutation at residue 237 (indicated in Figure 2) that causes the protein to be retained before the *mid*-Golgi (31). No activation of CTL F/F85-93 was observed, and we are thus unable to conclude if epitope F85-93 is generated in early or distal secretory compartments, as the mutation in the protein may be interfering with its processing. However, integrity of epitope F85-93 was controlled as activation of CTL F/F85-93 was observed when T2/K^d/TAP cells were infected with VAFS2 (Figure 5B, left panels). Furthermore, TAP-dependent presentation of epitope F85-93 was inhibited when T2/K^d/TAP cells were infected with VAFS2 in the presence of BFA or

LC (Figure 5B, right panel), indicating FS2 protein behaves as Fsig⁻ protein, F85-93 presentation is endogenous, dependent on TAP and on the proteasome.

Cleavage by furin in the TGN of secretory or membrane proteins is one of the known mechanisms by which the requirement for TAP can be bypassed (14,15). The F protein is naturally processed by furin to yield F1 and F2 subunits. It is thus possible that furin may be involved in the TAP-independent processing of epitope F85-93, located relatively close to furin cleavage site I at residue 109. We used several approaches to assess this issue. T2/K^d cells were infected with a collection of rVV expressing a transmembrane truncated secreted F protein in which furin cleavage sites have been mutated to interfere with the maturation of the protein (schematically indicated in Figure 2). T2/K^d cells infected with vvFtm⁻ were recognised by CTL F/F85-93 to a similar extent as those infected with vvF, indicating the transmembrane region is dispensable for presentation of the epitope. Figure 5C shows CTL F/F85-93 were activated after coculture with T2/K^d cells infected with secreted F lacking either one (vvFtm⁻ I⁻, vvFtm⁻ II⁻) or both (vvFtm⁻ I⁻ II⁻) furin cleavage sites. Presentation was endogenous as it was inhibited by BFA (data not shown). Although residual cleavage by furin-like proteases after Δ 131-134 in the protein encoded by vvFtm⁻ II⁻ might occur, our results strongly suggest that furin cleavage is not necessary for TAP-independent presentation of epitope F85-93.

In additional experiments, we found TAP-independent presentation of epitope F85-93 was somehow affected by an increase in levels of intracellular furin. Figure 5D shows that T2/K^d cells coinfecting with vvF and a rVV expressing bovine furin (vvbFur) were not able to activate CTL F/F85-93 as strongly as targets coinfecting with vvF and control parental strain WR. Therefore, increasing the intracellular levels of furin somewhat inhibits the TAP-independent presentation of epitope F85-93. To further investigate the role of furin in the endogenous TAP-independent presentation of epitope F85-93, we used decanoyl-RVKR-cloromethylketone (decRVKR-cmk), a substrate analogue that specifically inhibits furin and related proprotein convertases (32). We found activation of CTL F/F85-93 by vvF-infected T2/K^d targets was unaffected by the presence of decRVKR-cmk during infection (Figure 5E). Presentation of low concentrations of synthetic peptides in presence of decRVKR-cmk was controlled (data not shown). As an additional control, presentation from the secretory chimeric protein sC-A9 of the furin-dependent 9pp89 epitope was impaired

by decRVKR-cmk. Altogether our results indicate epitope F85-93 does not follow the endogenous TAP-independent presentation pathway mediated by furin.

Finally, the requirement for aminopeptidases that are known to play an important role in ER-trimming of precursor peptides was investigated. Infections were carried out in the presence of leucinethiol (LeuSH), a potent aminopeptidase inhibitor known to inhibit ERAP (33). Presentation of low concentrations of synthetic peptides in presence of LeuSH was controlled (data not shown). Inhibition of LeuSH-sensitive epitope NP₁₄₇₋₁₅₅ encoded as a secretory minigene in virus SNP_{A147-155} was controlled. Interestingly we found activation of CTL F/F85-93 was doubled when T2/K^d targets were infected with vvF in presence of LeuSH (Figure 5F). In other words, LeuSH increased presentation of epitope F85-93, suggesting a possible destructive role for ERAP in this TAP-independent pathway.

TAP-independent exogenous presentation of F249-258 in cells infected with vvF or vvFsig⁻

We demonstrated above that epitope F249-258 is presented independently of TAP following an atypical exogenous (BFA^R) pathway when the F protein is encoded in rVV. To elucidate if the epitope was actually present in the virus inoculum, infection of T2/K^d targets was not allowed to proceed after adsorption at 4 °C (infection time 0 h). Figure 6A shows almost no activation of CTL F/F249-258 was achieved, demonstrating the course of infection is necessary for the processing and presentation of the epitope.

TAP-independent entry to the ER of hydrophobic peptides generated by cytosolic processing has been shown for Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein LMP2 epitopes (18). Although this is an exceptional case we studied if the TAP-independent presentation of epitope F249-258 was dependent on the proteasome. TAP-deficient T2/K^d targets were infected with vvF or vvFsig⁻ in the presence of LC, and ICS assays were performed with CTL F/F249-258 (Figure 6B). Presentation of low concentrations of synthetic peptides in presence of LC was controlled (data not shown). LC had no effect on activation of CTL F/F249-258, demonstrating the proteasome is not involved in the TAP-independent exogenous presentation of epitope F249-258 from either protein.

Finally, furin may also be involved in exogenous TAP-independent processing of epitope F249-258, as this mainly TGN enzyme also cycles to the plasma

membrane and to endosomes (34). In fact production of MHC class I ligands can result from the processing by furin of antigenic proteins of endogenous origin (14,15), or of antigenic oligopeptides added exogenously (35,36). Therefore secreted F proteins mutated at the furin cleavage sites were also confronted to CTL F/F249-258, and no negative effect in activation was observed (Figure 6C). Presentation was resistant to BFA (data not shown). In contrast to CTL F/F85-93 (Figure 5C), CTL F/F249-258 activation by vvFtm⁻-infected cells was lower than when cells were infected with vvF, indicating the transmembrane region of the F protein may favour TAP-independent exogenous presentation of epitope F249-258, for unknown reasons. We rather detected a certain increase in presentation when site II was mutated, and therefore the protein conformation before maturation by furin may also favour TAP-independent exogenous presentation of epitope F249-258. However, our results rule out a role for furin in the TAP-independent exogenous presentation pathway for epitope F249-258, that takes place in cells infected with rVV.

DISCUSSION

In general, an antigen presented to CTL in cells infected with any virus is also presented to CTL when expressed in rVV. There is however little information concerning the conservation of the processing pathways of these antigens in their natural viral context and in the infection with rVV. In this study we assess in different viral contexts the processing and presentation of RSV F protein epitopes F85-93 and F249-258 presented by K^d. Our results indicate different presentation pathways exist depending on the epitope and the viral context of the antigen (summarised in Table I). Epitope F85-93 is presented through an endogenous (BFA^S) pathway dependent on TAP when the F protein is in either viral context, RSV or rVV. Moreover, in cells infected with rVV encoding wild type F, vvF, an endogenous TAP-independent pathway is also functioning. Epitope F249-258 is presented through a TAP-independent pathway that is endogenous (BFA^S) or mostly exogenous (BFA^R), depending of the viral context, RSV or rVV, respectively. Therefore, different processing pathways allow presentation of both epitopes to CTL in cells infected with either RSV or rVV.

TAP-independent presentation of RSV CTL epitopes has not been reported to date, although it has been documented for proteins of virus belonging as RSV to the *Paramyxoviridae* family. It is the case of the NP nucleoprotein of Sendai virus (22,37), the F protein of measles virus (19), or the N nucleocapsid proteins of measles virus and canine distemper virus (21). Therefore it is possible that paramyxovirus facilitate the access to TAP-independent antigen processing pathways for presentation to CTL.

Our results indicate vaccinia virus context allows TAP-independent presentation of RSV F protein CTL epitopes. However, no TAP-independent presentation of other paramyxovirus N proteins was observed when they were expressed from a rVV (21). Differences in the capacity of inducing CTL through TAP-independent pathways depending on the viral context have also been reported *in vivo*. It is possible to induce CTL specific for an herpes simplex virus epitope in TAP-deficient mice immunised with DNA or rVV, but not when infected with the natural virus (38). Although it is very infrequent to observe differences in presentation of an antigen when the viral context is changed to rVV, it must not be assumed, without confirmation, that the processing pathways in the natural viral context are conserved.

In RSV-infected cells, only epitope F249-258 is presented through a TAP-independent pathway (Table I). When the F protein is encoded in rVV, both epitopes, F85-93 and F249-258 are presented through TAP-independent processing pathways, although they are very different (Table I). TAP-independent presentation of epitope F85-93 is endogenous (BFA^S) and the epitope is not processed from cytosolic F protein. Therefore, different TAP-independent pathways are accessible to epitopes presented by the same MHC class I molecule and processed from the same protein encoded in rVV. The F protein behaves similarly to ER resident protein Jaw1, that when encoded in rVV, allows by three different mechanisms TAP-independent presentation of influenza virus epitope NP₁₄₇₋₁₅₅ presented by K^d. Depending on the insertion site of the epitope and the use of wild type or mutated Jaw1, TAP-independent presentation requires the action of signal peptidase, of an unknown endoprotease in the secretory pathway, or of unidentified cytosolic proteases (13,17).

Concerning presentation dependent on TAP, both epitopes are also very different, as we can only unequivocally detect this pathway for epitope F85-93 in both viral contexts (Table I). This major qualitative difference in the processing and presentation of epitopes F85-93 and F249-258, may be related to the immunodominance pattern observed in *in vitro* generated CTL lines and *in vivo* secondary responses (26). The processing by the proteasome of F85-93 epitope, but not of epitope F249-258, may be the fact that determines F249-258 subdominance.

Pathways for presentation of epitope F85-93 to CTL

In vvF-infected cells, epitope F85-93 can be presented both by TAP-dependent and TAP-independent pathways, as it has been shown for presentation of some HIV CTL epitopes in cells infected with a rVV encoding the envelope protein (11).

Epitope F85-93 is processed through an endogenous TAP-dependent pathway when the F protein is in its natural viral context or in rVV. The proteasome mediates this pathway in cells infected with rVV encoding either native F protein, a cytosolic form, or a mutant F protein that is retained before the *mid*-Golgi. We do not know if the proteasome generates the final epitope or a precursor. It is possible that the F protein in the context of RSV can also be processed by the proteasome, but this question was not able to be addressed due to technical problems.

Moreover, the expression of the F protein from a rVV allows processing of epitope F85-93 through an endogenous (BFA^S) and TAP-independent pathway, that

is not accessible to proteins Fsig⁻ or FS2 encoded in rVV, or for the F protein in its natural viral context. Therefore, the viral context of the F protein seems to be critical for F85-93 TAP-independent presentation. The T2 cell line is a lymphoblastoid hybrid of a human T cell line and a human B cell line selected on the loss of MHC class II expression induced by irradiation (39). Endogenous presentation of RSV F epitopes demonstrates RSV infects T2 cells, which is expected as RSV can infect human B lymphocytes *in vitro* (40). Although we cannot rule out effects that depend on the different biology of the two viral infections, it is possible that with RSV, with a lower infectivity of T2 cells, we can only detect presentation of epitope F85-93 through the pathway in which the loading of K^d molecules is more efficient, that in this case we postulate is the pathway dependent on TAP.

Signal peptidase is one of the two proteases that have been identified in TAP-independent pathways, it is implicated in the presentation of epitopes located at or very near its cleavage site. However, the signal sequence of the F protein corresponds to residues 1-21, so we have ruled out a role for signal peptidase in the TAP-independent processing of epitope F85-93. The second protease identified in a TAP-independent endogenous presentation pathway is furin, resident in the TGN, and known to be involved in the generation of several epitopes presented by all MHC class I molecules tested including K^d ((14,15), and unpublished results). We have studied in depth the role of furin in the endogenous and TAP-independent presentation of epitope F85-93, located relatively close to furin cleavage site I at residue 109. Our results also rule out a role for furin.

Endogenous presentation mediated by furin has been described with a chimeric protein in which peptides with viral epitopes are liberated by furin during maturation, always introducing the epitopes in a portion that is not part of the mature protein and is thus prone to degradation (14,15). The fact that epitope F85-93 is located in the mature protein may limit the access of further trimming proteases to the F2 subunit product of furin. Besides, cleavage by furin occurs in a residue located farther from the epitope than in other studied cases, and this may difficult the task of enzymes such as amino and carboxypeptidases that would contribute to give the correct size final peptide, rendering unviable, due to inefficacy, this pathway. Probably, TAP-independent presentation of epitope F85-93, requires the action of an endoprotease of the secretory pathway, that is neither signal peptidase nor furin.

Aminopeptidase inhibitor LeuSH potentiates F85-93 TAP-independent presentation. Given that the ER aminopeptidase associated to antigen processing ERAAP/ERAP carries out the final trimming of precursor peptides, its inhibition frequently inhibits antigen presentation. However, previous studies have also reported potentiation of the presentation of certain antigenic peptides in cells treated with LeuSH (41) or with ERAAP specific interfering ARN (4). We do not know if LeuSH^S aminopeptidases participate directly in the processing of F85-93, or if potentiation is an indirect effect due to the presence of less peptides that compete with F85-93 for binding to K^d. Nonetheless, bearing in mind that ER aminopeptidases are more sensitive to LeuSH than cytosolic aminopeptidases (41), we consider more probable that critical residues for binding of F85-93 to K^d would be trimmed and destroyed by ERAP.

Pathways for presentation of epitope F249-258 to CTL

Epitope F249-258 is presented through different TAP-independent pathways depending on the viral context of the F protein. In RSV-infected cells presentation is endogenous (BFA^S), whereas after infection with rVV that encode native or cytosolic F, presentation is mostly exogenous (BFA^R) (Table I). The existence of a BFA^R pathway complicates enormously the interpretation of our results, as a BFA^S pathway would remain hidden. On the other hand, our data do not support firmly the possibility of an endogenous pathway dependent on TAP for F249-258, nor the participation of the proteasome in it (Table I).

The fact that rVV, and not RSV, allows presentation of F249-258 through a BFA^R pathway may be explained if presentation was due to F249-258 precursors that were not synthesised endogenously but that were present in the virus inoculum. The fact that TAP-independent exogenous presentation of F249-258 requires the course of infection, allows us to conclude that the exact epitope is not present in the virus inoculum. F249-258 precursors may exist in the inoculum of rVV, as during its morphogenesis the viral particle incorporates membranous envelopes from the secretory pathway. F249-258 precursors present in the viral inoculum may be processed at the plasma membrane, or may require internalisation for further processing. The epitope would be loaded on K^d by peptide exchange on preloaded K^d molecules of the secretory pathway or at the plasma membrane, or in recycling K^d molecules in the endocytic pathway. If F249-258 precursors in fact do exist in the

virus inoculum, they must be very stable peptides that are not degraded during the production, purification, and storing of the virus inoculum. This hypothesis may be elucidated by the use of inactivated virus, although the inactivation method can be critical for the further presentation of the epitope, as has been shown for other viruses (42). On the other hand, F249-258 precursors would not be incorporated in the RSV inoculum.

The fact that the cytosolic F protein is not abundant and that it does not associate to membranes as native F, may question the presence of as much F249-258 precursors in the vvFsig⁻ inoculum as in that of vvF. In fact, the presentation of F249-258 through a BFA^R pathway accessible to cytosolic F led us to exhaustively control the absence of leaks of cytosolic peptides to the ER of T2/K^d cells. Thus, another hypothesis to explain our results would imply the access to BFA^R compartments of F249-258 precursors generated from F and Fsig⁻ proteins by cytosolic proteases, and not by the proteasome. Different studies that use T2 cells to investigate TAP-independent presentation of epitopes expressed from plasmids or viruses such as rVV, propose the existence of TAP-independent mechanisms that allow translocation of cytosolic peptides (11,16-18). Translocation of antigenic peptides in microsomes obtained from T2 cells has also been documented (43). Also, the study of natural K^d ligands in cells with or without TAP reveals that in the absence of TAP K^d binds longer peptides, and it has been suggested that these peptides may access the MHC class I antigen presentation pathway through a TAP-independent mechanism (44). On the other hand, it has also been reported that cytosolic endogenous antigens can be presented by MHC class II (45), that in general present long peptides processed from exogenous antigen in endolysosomal compartments. In T2 cells the presence of MHC class I molecules in MHC class II compartments has been demonstrated (19). Therefore, we must consider the possibility that the supposed F249-258 precursors derived from F and Fsig⁻ proteins may be translocated, from the cytosol to distal compartments in the secretory pathway, by an unknown TAP and signal sequence independent mechanism. Again, the different biology of the infection of each virus may explain the fact that this access of peptides from the cytosol to BFA^R compartments is only detected in rVV-infected cells, and not in RSV-infected cells, as rVV strongly interacts with the intracellular membranous system.

Special features of the F protein may play a role in the TAP-independent exogenous presentation of F249-258, affecting only epitope F249-258, and not F85-93. For instance several hydrophobic regions are close to F249-258, such as the heptad repeat HRA located at residues 156-201 (46). Moreover, a segment of the F protein of Sendai virus is able to induce membrane fusion (47), corresponding to residues 221-242 of the F protein of RSV (48), very near to F249-258. The possibility even exists for the transmembrane region (residues 525-550) to function as a signal sequence (49), although it is located far away from F249-258. Another possibility is that the fusion peptide, once processed, separating thus F249-258 from F85-93, may be sufficiently hydrophobic to interact stably with membranes, as has been reported for the F protein of another paramyxovirus whose fusion peptide can act as a transmembrane region converting a soluble protein in a membrane associated protein (50).

The fact that epitope F249-258 is presented to CTL through an exogenous pathway, in addition to being located near neutralizing antibody antigenic site II (27), is of interest for the development of vaccines against human RSV in murine models, as it opens the possibility of priming CTL *in vivo* with a non infectious virus or even with purified protein. It may be possible that during RSV *in vivo* infection professional antigen presenting cells may prime CD8⁺ T lymphocytes specific for epitope F249-258 through a cross-presentation pathway similar to the exogenous pathway reported in T2/K^d cells infected with rVV.

MATERIALS AND METHODS

Viruses

Human RSV Long was grown in HEp-2 monolayers and titrated as described previously (51).

Construction of rVV vvF containing the F gene of the Long strain of RSV has been described (52). Recombinant vvFsig⁻ encodes a cytosolic F protein in which the first 21 aa corresponding to the signal peptide have been deleted introducing a new AUG codon before the sequence encoding F22 (30). Recombinant vvFtm⁻ encodes a secreted form of the F protein by deletion of the last 50 aa encoding the transmembrane region (30). Construction of rVV expressing an Ftm⁻ protein in which furin cleavage sites have been mutated has been described (23). Cleavage site I is mutated by aa substitution in vvFtm⁻ R108N/R109N (vvFtm⁻ I⁻), and cleavage site II is mutated by aa deletion in vvFtm⁻ Δ131-134 (vvFtm⁻ II⁻). Thus, vvFtm⁻ R108N/R109N Δ131-134 (vvFtm⁻ I⁻ II⁻) encodes a secreted F protein that remains as uncleaved F0. Construction of virus VAFS2 encoding a form of the F protein that is retained before the *mid*-Golgi due to a single mutation, F237S, has been described (31). vvbFur encodes the bovine furin protease in a Western Reserve (WR) vaccinia strain (53), and was provided by Dr. W. Garten (Marburg University, Marburg, Germany). rVV NP_{M147-155} (54) and SNP_{A147-155} (55) express epitope NP₁₄₇₋₁₅₅ from a cytosolic or a secretory minigene. rVV sC-A9 encodes a chimeric protein derived from hepatitis B virus secretory core protein (HBe) by insertion in its carboxy termini of murine CMV 9pp89 epitope (14).

Cell lines

T2/K^d are human lymphoblastoid T2 cells deficient in TAP and transfected with K^d; T2/K^d/TAP are also transfected with rat TAP1 and TAP2 genes (56). Both cell lines were provided by Dr. G. Hämmerling (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany). T2/L^d are transfected with L^d (57) and were provided by Dr. P. Cresswell (Yale University, New Haven, CT) through Dr. M. Groettrup (Cantonal Hospital St. Gallen, Switzerland). All T2 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, and in a 9% CO₂ atmosphere. L/K^d derived from L murine fibroblasts express TAP and are

transfected with K^d (55), and were provided by Dr. J. Yewdell (National Institutes of Health, Bethesda, MD). L/K^d were cultured in Iscove's modified Dulbecco medium supplemented with 10% foetal bovine serum, and in a 5% CO₂ atmosphere. All cell lines were cultured at 37 °C.

Polyclonal CTL lines

CTL lines were named indicating the virus used for priming *in vivo* and the agent used for restimulation *in vitro*. Generation of CTL lines has been described (26). Briefly, splenocytes were obtained from vvF-infected BALB/c mice (H-2^d haplotype). The CTL F/F85-93 and CTL F/F249-258 lines were generated by stimulation with 10⁻¹⁰ M F85-93 peptide or 10⁻⁹ M F249-258 peptide, respectively. Peptide sequences are F85-93, KYKNAVTEL; and F249-258, TYMLTNSELL. Peptide synthesis has been described (26). Generation of CTL 9pp89 has been described (58). CTL NP₁₄₇₋₁₅₅ were generated from BALB/c mice infected with a rVV encoding influenza virus NP protein.

Virus infection and intracellular cytokine staining (ICS) assay

ICS assays to detect recognition by CTL of antigens presented on infected cells were performed as described previously (59) with modifications (26). CTL lines were stimulated in the presence of 10 µg ml⁻¹ BFA (Sigma) with T2/K^d or T2/K^d/TAP target cells infected with RSV or rVV. Stimulation was performed for 4 h when targets were infected with RSV, or overnight when targets were infected with rVV, unless stated otherwise. Infection with RSV was performed at a m.o.i. of 0.3-3 p.f.u. per cell, virus inoculum was thoroughly washed after 90 min adsorption, and infection was allowed to proceed for 16-40 h prior to ICS. Infection with rVV was performed at a m.o.i. of 3 p.f.u. per cell as described (60), virus inoculum was thoroughly washed after 1 h adsorption, and infection was allowed to proceed prior to ICS for 4-6 h, unless otherwise stated. For infection at time 0 h, adsorption was performed at 4 °C, and virus inoculum was washed in the presence of BFA prior to assay. Adsorption in presence of inhibitors was performed at 5 times the concentration maintained during infection. BFA was used during infection at 5 µg ml⁻¹. Infection in the presence of the proteasome inhibitor lactacystin (LC; Dr. E. J. Corey, Harvard University, Cambridge, MA) was carried out at 10 µM LC. Infection in the presence of furin inhibitor decRVKR-cmk (Bachem) was performed at 50 µM. Aminopeptidase inhibitor LeuSH

(Bachem) was used at 30 μ M during infection in medium containing freshly added 2-mercaptoethanol. Percentage specific inhibition was calculated from formula $100 \times \{[(X - N) - (X_i - N_i)] / (X - N)\}$ where X represents the percentage of total CD8⁺ lymphocytes that stained for IFN γ when targets were infected with RSV or rVV, X_i is the value when infection was carried out in presence of the inhibitor, and N and N_i are the equivalent values when targets were mock infected with medium or infected with rVV parental strain WR. When exogenous peptide was used, it was added during infection and ICS assay coculture. Coculture was performed at E:T ratio 1:5. Following stimulation, cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD8 α mAb (ProImmune), fixed with Intrastain kit (DakoCytomation) reagent A and incubated with phycoerythrin-conjugated mAb to IFN γ (Becton Dickinson) while permeabilizing with Intrastain kit reagent B (26). Events were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and data were analysed using CellQuest software (Becton Dickinson). An average of 5,000 CD8⁺ cells were analysed in each sample. Several experiments were also duplicated with the more classical ⁵¹Cr-release cytotoxicity assay and gave essentially the same results.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. J. Yewdell for rVV and Drs. G. Hämmerling, P. Cresswell, M. Groettrup and J. Yewdell for cell lines. Recombinant human interleukin 2 was a gift of the NCI Preclinical Repository. Establishment of the 9pp89-specific CTL lines was thanks to Dr. Y. Samino. Technical assistance of C. Mir and S. Sánchez is gratefully acknowledged, as well as peptide synthesis from our central facility. This work was supported by grants from Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, Instituto de Salud Carlos III, and Comunidad de Madrid. C.J. was supported by a FPI fellowship from Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, and S.G. by Instituto de Salud Carlos III. The authors declare that they have no financial conflict of interest.

REFERENCES

- (1) Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW et al. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 2004; 20(4):495-506.
- (2) Powis SJ, Young LL, Joly E, Barker PJ, Richardson L, Brandt RP et al. The rat *cim* effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 1996; 4:159-165.
- (3) Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P et al. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 2003; 18(1):97-108.
- (4) Serwold T, González F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002; 419(6906):480-483.
- (5) York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 2002; 3(12):1177-1184.
- (6) Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S et al. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase - The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem* 2003; 278(34):32275-32283.
- (7) Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, López D, Lepelletier Y et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* 2005; 6(7):689-697.
- (8) Henderson RA, Michel H, Sakaguchi K, Shabanowitz J, Appella E, Hunt DF et al. HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* 1992; 255(5049):1264-1266.
- (9) Wei ML, Cresswell P. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* 1992; 356(6368):443-446.
- (10) Hammond SA, Bollinger RC, Tobery TW, Siliciano RF. Transporter-independent processing of HIV-1 envelope protein for recognition by CD8⁺ T cells. *Nature* 1993; 364(6433):158-161.
- (11) Hammond SA, Johnson RP, Kalams SA, Walker BD, Takiguchi M, Safrit JT et al. An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway and a more general TAP-1/2-dependent antigen-processing pathway allow recognition of the HIV-1 envelope glycoprotein by CD8⁺ CTL. *J Immunol* 1995; 154(11):6140-6156.
- (12) Elliott T, Willis A, Cerundolo V, Townsend A. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1995; 181(4):1481-1491.
- (13) Snyder HL, Bacík I, Yewdell JW, Behrens TW, Bennink JR. Promiscuous liberation of MHC-class I-binding peptides from the C termini of membrane and soluble proteins in the secretory pathway. *Eur J Immunol* 1998; 28(4):1339-1346.

- (14) Gil-Torregrosa BC, Castaño AR, Del Val M. Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the *trans*-Golgi network protease furin. *J Exp Med* 1998; 188(6):1105-1116.
- (15) Gil-Torregrosa BC, Castaño AR, López D, Del Val M. Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic* 2000; 1(8):641-651.
- (16) Zweerink HJ, Gammon MC, Utz U, Sauma SY, Harrer T, Hawkins JC et al. Presentation of endogenous peptides to MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells. *J Immunol* 1993; 150(5):1763-1771.
- (17) Snyder HL, Bacík I, Bennink JR, Kearns G, Behrens TW, Bächli T et al. Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J Exp Med* 1997; 186(7):1087-1098.
- (18) Lautscham G, Mayrhofer S, Taylor G, Haigh T, Leese A, Rickinson A et al. Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8⁺ T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway. *J Exp Med* 2001; 194(8):1053-1068.
- (19) Grommé M, Uytdehaag FGCM, Janssen H, Calafat J, van Binnendijk RS, Kenter MJH et al. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(18):10326-10331.
- (20) Schirmbeck R, Reimann J. Alternative processing of endogenous or exogenous antigens extends the immunogenic, H-2 class I-restricted peptide repertoire. *Mol Immunol* 2002; 39(3-4):249-259.
- (21) Neumeister C, Nanan R, Cornu TI, Lüder CGK, ter Meulen V, Naim H et al. Measles virus and canine distemper virus target proteins into a TAP-independent MHC class I-restricted antigen-processing pathway. *J Gen Virol* 2001; 82(2):441-447.
- (22) Zhou X, Glas R, Liu T, Ljunggren HG, Jondal M. Antigen processing mutant T2 cells present viral antigen restricted through H-2K^b. *Eur J Immunol* 1993; 23(8):1802-1808.
- (23) González-Reyes L, Ruiz-Argüello MB, García-Barreno B, Calder L, López JA, Albar JP et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(17):9859-9864.
- (24) Zimmer G, Budz L, Herrler G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* 2001; 276(34):31642-31650.
- (25) Chang J, Srikiatkachorn A, Braciale TJ. Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8⁺ T cells during experimental virus infection. *J Immunol* 2001; 167(8):4254-4260.
- (26) Johnstone C, de León P, Medina F, Melero JA, García-Barreno B, Del Val M. Shifting immunodominance pattern of two cytotoxic T-lymphocyte epitopes in the F glycoprotein of the Long strain of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 2004; 85(11):3229-3238.

- (27) López JA, Bustos R, Örvell C, Berois M, Arbiza J, García-Barreno B et al. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol* 1998; 72(8):6922-6928.
- (28) Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri HP, Yuan LC et al. Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 1990; 60(5):821-836.
- (29) Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL et al. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 1997; 272(20):13437-13445.
- (30) Bembridge GP, López JA, Bustos R, Melero JA, Cook R, Mason H et al. Priming with a secreted form of the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) promotes interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production but not pulmonary eosinophilia following RSV challenge. *J Virol* 1999; 73(12):10086-10094.
- (31) López JA, Bustos R, Portela A, García-Barreno B, Melero JA. A point mutation in the F₁ subunit of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein blocks its cell surface transport at an early stage of the exocytic pathway. *J Gen Virol* 1996; 77(4):649-660.
- (32) Garten W, Hallenberger S, Ortmann D, Schafer W, Vey M, Angliker H et al. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* 1994; 76(3-4):217-225.
- (33) Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL et al. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 2002; 3(12):1169-1176.
- (34) Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(10):753-766.
- (35) Lu J, Wettstein PJ, Higashimoto Y, Appella E, Celis E. TAP-independent presentation of CTL epitopes by trojan antigens. *J Immunol* 2001; 166(12):7063-7071.
- (36) Lu J, Higashimoto Y, Appella E, Celis E. Multiepitope trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses. *J Immunol* 2004; 172(7):4575-4582.
- (37) Liu TM, Zhou XZ, Örvell C, Lederer E, Ljunggren HG, Jondal M. Heat-inactivated Sendai virus can enter multiple MHC class I processing pathways and generate cytotoxic T lymphocyte responses *in vivo*. *J Immunol* 1995; 154(7):3147-3155.
- (38) Paliard X, Doe B, Selby MJ, Hartog K, Lee AY, Burke RL et al. Induction of herpes simplex virus gB-specific cytotoxic T lymphocytes in TAP1-deficient mice by genetic immunization but not HSV infection. *Virology* 2001; 282(1):56-64.
- (39) Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 1985; 21(3):235-246.
- (40) Bangham CR, McMichael AJ. Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(23):9183-9187.

- (41) Serwold T, Gaw S, Shastri N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat Immunol* 2001; 2(7):644-651.
- (42) Yewdell JW, Bennink JR, Hosaka Y. Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* 1988; 239(4840):637-640.
- (43) Lévy F, Gabathuler R, Larsson R, Kvist S. ATP is required for *in vitro* assembly of MHC class I antigens but not for transfer of peptides across the ER membrane. *Cell* 1991; 67(2):265-274.
- (44) Suri A, Walters JJ, Levisetti MG, Gross ML, Unanue ER. Identification of naturally processed peptides bound to the class I MHC molecule H-2K^d of normal and TAP-deficient cells. *Eur J Immunol* 2006; 36(3):544-557.
- (45) Jaraquemada D, Marti M, Long EO. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* 1990; 172(3):947-954.
- (46) Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, Kim PS. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(26):14172-14177.
- (47) Peisajovich SG, Samuel O, Shai Y. Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion. *J Mol Biol* 2000; 296(5):1353-1365.
- (48) Smith BJ, Lawrence MC, Colman PM. Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. *Protein Eng* 2002; 15(5):365-371.
- (49) Brock SC, Heck JM, McGraw PA, Crowe JE, Jr. The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation-independent apical plasma membrane sorting sequence. *J Virol* 2005; 79(19):12528-12535.
- (50) Paterson RG, Lamb RA. Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a paramyxovirus F protein to act as a membrane anchor. *Cell* 1987; 48(3):441-452.
- (51) García-Barreno B, Jorcano JL, Aukenbauer T, López-Galíndez C, Melero JA. Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus (RSV). *Virus Res* 1988; 9(4):307-321.
- (52) Bembridge GP, López JA, Cook R, Melero JA, Taylor G. Recombinant vaccinia virus coexpressing the F protein of respiratory syncytial virus (RSV) and interleukin-4 (IL-4) does not inhibit the development of RSV-specific memory cytotoxic T lymphocytes, whereas priming is diminished in the presence of high levels of IL-2 or gamma interferon. *J Virol* 1998; 72(5):4080-4087.
- (53) Vey M, Schäfer W, Berghöfer S, Klenk HD, Garten W. Maturation of the *trans*-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* 1994; 127(6):1829-1842.
- (54) Bacik I, Cox JH, Anderson R, Yewdell JW, Bennink JR. TAP (transporter associated with antigen processing)-independent presentation of endogenously synthesized peptides is enhanced by endoplasmic reticulum insertion sequences located at the amino- but not carboxyl-terminus of the peptide. *J Immunol* 1994; 152(2):381-387.

- (55) Eisenlohr LC, Bacik I, Bennink JR, Bernstein K, Yewdell JW. Expression of a membrane protease enhances presentation of endogenous antigens to MHC class I-restricted T lymphocytes. *Cell* 1992; 71(6):963-972.
- (56) Zhou X, Momburg F, Liu T, Abdel Motal UM, Jondal M, Hämmerling GJ et al. Presentation of viral antigens restricted by H-2K^b, D^b or K^d in proteasome subunit LMP2- and LMP7-deficient cells. *Eur J Immunol* 1994; 24(8):1863-1868.
- (57) Crumpacker DB, Alexander J, Cresswell P, Engelhard VH. Role of endogenous peptides in murine allogenic cytotoxic T cell responses assessed using transfectants of the antigen-processing mutant 174xCEM.T2. *J Immunol* 1992; 148(10):3004-3011.
- (58) López D, Del Val M. Selective involvement of proteasomes and cysteine proteases in MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 1997; 159(12):5769-5772.
- (59) Chen W, Antón LC, Bennink JR, Yewdell JW. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 2000; 12(1):83-93.
- (60) Eisenlohr LC, Yewdell JW, Bennink JR. Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 175(2):481-487.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. In RSV-infected cells antigen presentation to CTL is endogenous, dependent on TAP for epitope F85-93 and mainly TAP-independent for epitope F249-258. TAP-deficient T2/K^d cells **(A)** or T2/K^d/TAP cells **(B)** were infected for the indicated times and m.o.i. with RSV. ICS assays were performed by stimulating CTL F/F85-93 or CTL F/F249-258, monospecific for epitopes F85-93 and F249-258, respectively, with the indicated targets in the presence of BFA to intracellularly accumulate IFN γ produced upon activation of CTL. Percentages of total CD8⁺ lymphocytes that stained for IFN γ are represented (left panels). Infection was carried out at a m.o.i. of 3 for 15 h also in the presence of BFA to block the endogenous secretory pathway, and percentage specific inhibition was calculated (right panels). ICS assays were performed and activation by limiting concentrations of peptides controlled in presence or not of BFA (n.d., not determined).

FIGURE 2. rVV encoding different forms of RSV F protein used in this study. Virus vvF encodes wild type F protein of RSV. Hydrophobic regions corresponding to the signal peptide (sp), the fusion peptide (fp), and the transmembrane region (tm) are indicated. Processing by furin-like proteases at cleavage sites I and II (arrows) yields the F1 and F2 subunits that remain linked by a disulfide bond. CTL epitopes (\blacktriangle) presented by K^d assessed in this study are F85-93 (KYKNAVTEL) and F249-258 (TYMLTNSELL). Virus vvFsig⁻ encodes a cytosolic form of the F protein. Virus VAFS2 encodes a protein that has the indicated point mutation and that is retained in the secretory route before the *mid*-Golgi. Virus vvFtm⁻ encodes a protein that is secreted. Virus vvFtm⁻ I⁻, vvFtm⁻ II⁻ and vvFtm⁻ I⁻ II⁻ encode secreted F proteins lacking one or both furin cleavage sites. WR was the parental strain of the represented viruses.

FIGURE 3. TAP-independent presentation of epitopes F85-93 and F249-258 in rVV-infected cells. **(A)** ICS assays were performed with TAP-deficient T2/K^d cells infected with the indicated virus and CTL F/F85-93 or CTL F/F249-258. Data are the mean of at least 4 independent experiments. **(B)** ICS assay performed with CTL specific for influenza virus nucleoprotein epitope NP₁₄₇₋₁₅₅ presented by K^d. Targets were T2/K^d or T2/K^d/TAP cells infected for 1 h with parental strain WR, rVV encoding

minigenes that express a cytosolic (NP_{M147-155}) or secretory (SNP_{A147-155}) miniprotein with epitope NP₁₄₇₋₁₅₅, or WR in presence of peptide NP₁₄₇₋₁₅₅. The same results were obtained when T2/K^d cell infection was carried out for 3 h. **(C)** T2/K^d cells were infected in presence of inhibitor BFA with the indicated virus. ICS assays were performed, percentage specific inhibition was calculated, and activation by limiting concentrations of peptides controlled in presence or not of BFA. Data are the mean of at least 5 independent experiments.

FIGURE 4. rVV-expressed epitope F85-93 is also processed by the proteasome in a TAP-dependent pathway, unlike epitope F249-258. (A) ICS assays were performed with T2/K^d/TAP cells infected with the indicated virus and CTL F/F85-93 or CTL F/F249-258. Data are the mean of at least 4 independent experiments. T2/K^d/TAP cells were infected with the indicated virus in presence of BFA **(B)** or proteasome-specific inhibitor LC **(C)**. ICS assays were performed and CTL activation by limiting concentrations of peptides controlled in presence or not of BFA or LC. Percentage specific inhibition is represented. Data are from one to three independent experiments (BFA); or three to four independent experiments (LC).

FIGURE 5. TAP-independent endogenous presentation of epitope F85-93 is not mediated by furin and is interfered by LeuSH-sensitive aminopeptidases. ICS assays were performed with CTL F/F85-93 and T2/K^d cells, unless otherwise indicated. **(A)** Cells were infected with vvF in presence of LC. ICS assays were performed and CTL activation by limiting concentrations of peptide controlled in presence or not of LC. Data are from two independent experiments. **(B)** Cells were infected with VAFS2, encoding a form of F protein that is retained before the *mid*-Golgi. Left panels correspond to data from three independent experiments. Right panel data correspond to an assay in which cells were infected in presence of BFA or LC. CTL activation by limiting concentrations of peptide was controlled. **(C)** Cells were infected with the indicated virus. Data are the mean of two independent experiments in which infection was performed for 4 or 15 h. In one of the experiments infection was also carried out in presence of BFA, and a specific inhibition of 100% was observed. **(D)** Cells were infected at a m.o.i. of 3 with vvF or WR, and coinfecting with vvbFur expressing bovine furin protease or WR when indicated. Coinfection was performed at a m.o.i. of 1. Data correspond to a representative experiment of two. **(E)**

Cells were infected with vvF or parental strain WR in presence or not of furin inhibitor decRVKR-cmk (indicated as RVKR). Specific inhibition was 10%. CTL activation by peptide in the presence of the inhibitor was controlled. Data correspond to an assay that is representative of 3 independent experiments. Inhibition of furin-dependent epitope 9pp89 encoded in virus sC-A9 constructed from parental strain HBe was controlled and is represented. **(F)** Cells were infected with vvF or parental strain WR in presence or not of aminopeptidase inhibitor LeuSH. CTL activation by peptide in the presence of the inhibitor was controlled. Specific increase of presentation of vvF was 95% calculated from formula $100 \times \{[(X_i - X) - (WR_i - WR)] / (X - WR)\}$ where X represents the percentage of total CD8⁺ lymphocytes that stained for IFN γ when targets were infected with vvF, X_i is the value when infection was carried out in presence of the inhibitor, and WR and WR_i are the equivalent values when targets were infected with parental strain WR. Data correspond to an assay that is representative of 3 independent experiments. Inhibition of LeuSH-sensitive epitope NP₁₄₇₋₁₅₅ encoded as a secretory miniprotein in virus SNP_{A147-155} was controlled and is represented.

FIGURE 6. TAP-independent exogenous presentation of epitope F249-258 requires the course of infection and is not mediated by the proteasome or by furin. ICS assays were performed with CTL F/F249-258 and T2/K^d cells. **(A)** Cells were infected with vvF or parental strain WR for 5 h (after 1 h adsorption at 37° C) or 0 h (1 h adsorption performed at 4° C). Data correspond to the mean of two independent experiments where inhibition of presentation of vvF by BFA was of 70%. **(B)** Cells were infected in presence of LC with the indicated virus. ICS assays were performed and CTL activation by limiting concentrations of peptide controlled in presence or not of LC. Data are from two independent experiments. **(C).** Cells were infected with the indicated virus. Data are the mean of two independent experiments in which infection was performed for 4 or 15 h. In one of the experiments infection was also carried out in presence of BFA, and the mean specific inhibition for vvFtm⁺ I⁺, vvFtm⁺ II⁺, and vvFtm⁺ I⁺ II⁺ was 15%.

Table I. Compilation of the pathways described for the presentation by K^d of epitopes F85-93 and F249-258. The TAP-dependent or TAP-independent pathways described for epitopes F85-93 and F249-258 attending to the viral context (rVV or RSV) and the form of F protein (native or cytosolic) are indicated. In each case attending to sensibility or resistance to BFA presentation is defined as endogenous (BFA^S) or exogenous (BFA^R). The sensibility or resistance to proteasome specific inhibitor LC or aminopeptidase inhibitor LeuSH is indicated when known.

Viral context	F protein	Presentation dependent on TAP		TAP-independent Presentation	
		F85-93 ^a	F249-258	F85-93 ^a	F249-258
VRS	native F	+ endogenous (BFA ^S)	^b	-	+ endogenous (BFA ^S)
rVV	native F	+ endogenous (BFA ^S) proteasome (LC ^S)	^b	+ endogenous (BFA ^S) increased by LeuSH LC ^R	+ ^c exogenous (BFA ^R) LC ^R
rVV	cytosolic F ^a (Fsig ⁻)	+ endogenous (BFA ^S) proteasome (LC ^S)	^b	-	+ ^c exogenous (BFA ^R) LC ^R

^aConcerning presentation of epitope F85-93, protein FS2 retained before the *mid*-Golgi and encoded in rVV VAFS2, behaved exactly as cytosolic F (see Figure 5).

^bData in Figures 1 and 4 may be suggestive, but not conclusive, of a minor endogenous pathway dependent on TAP for presentation of epitope F249-258 in cells infected with either virus.

^cIn rVV-infected cells a total resistance to BFA was not observed, and thus an endogenous pathway cannot be ruled out (see Figure 3).

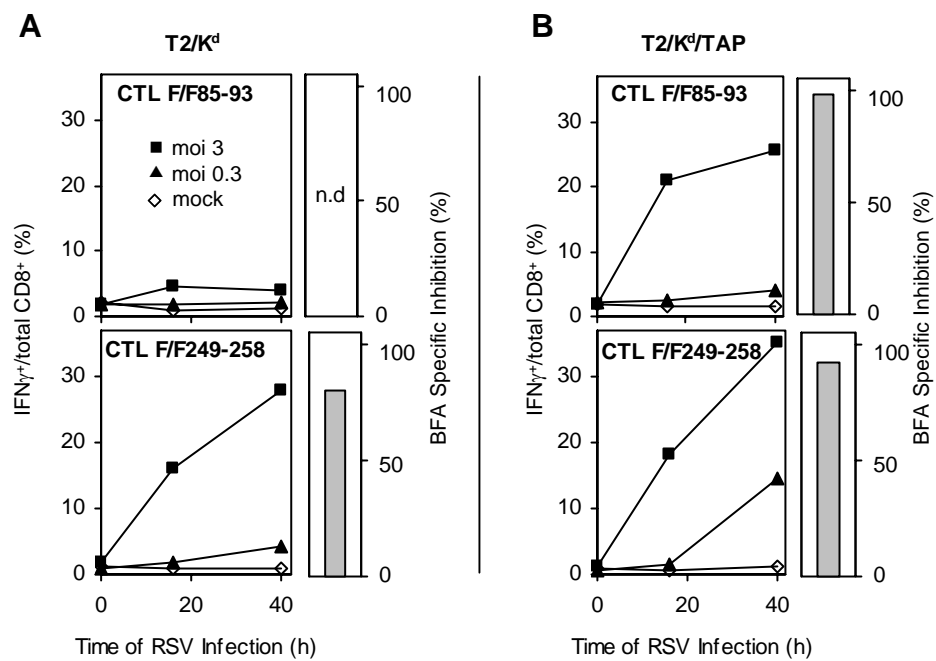


Figure 1.

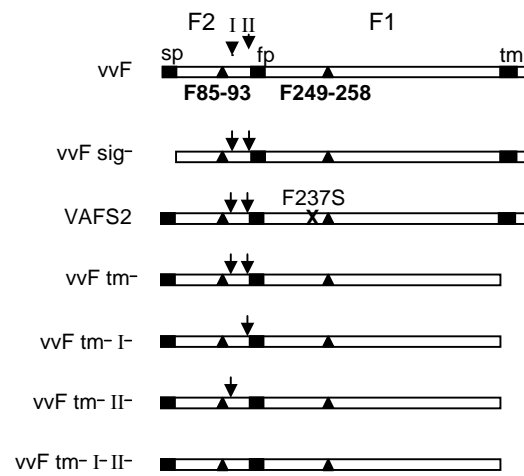


Figure 2.

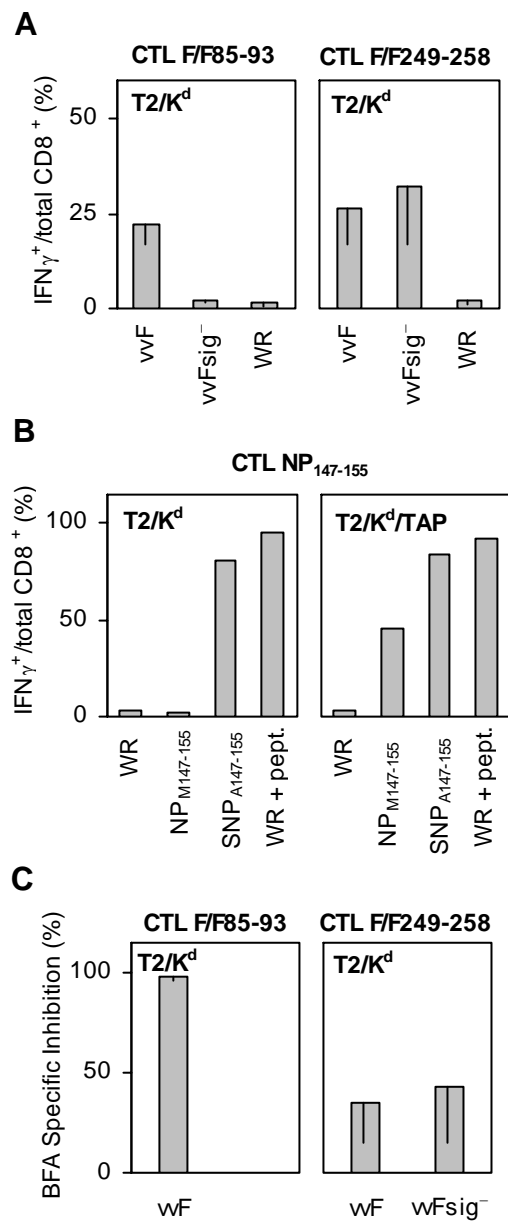


Figure 3.

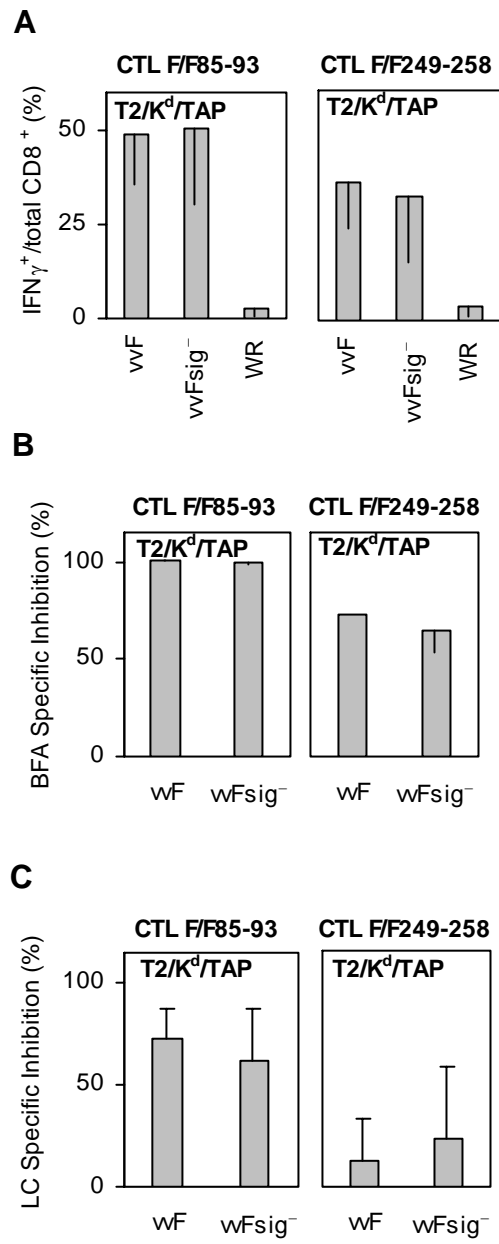


Figure 4.

TAP-independent endogenous presentation of epitope F85-93

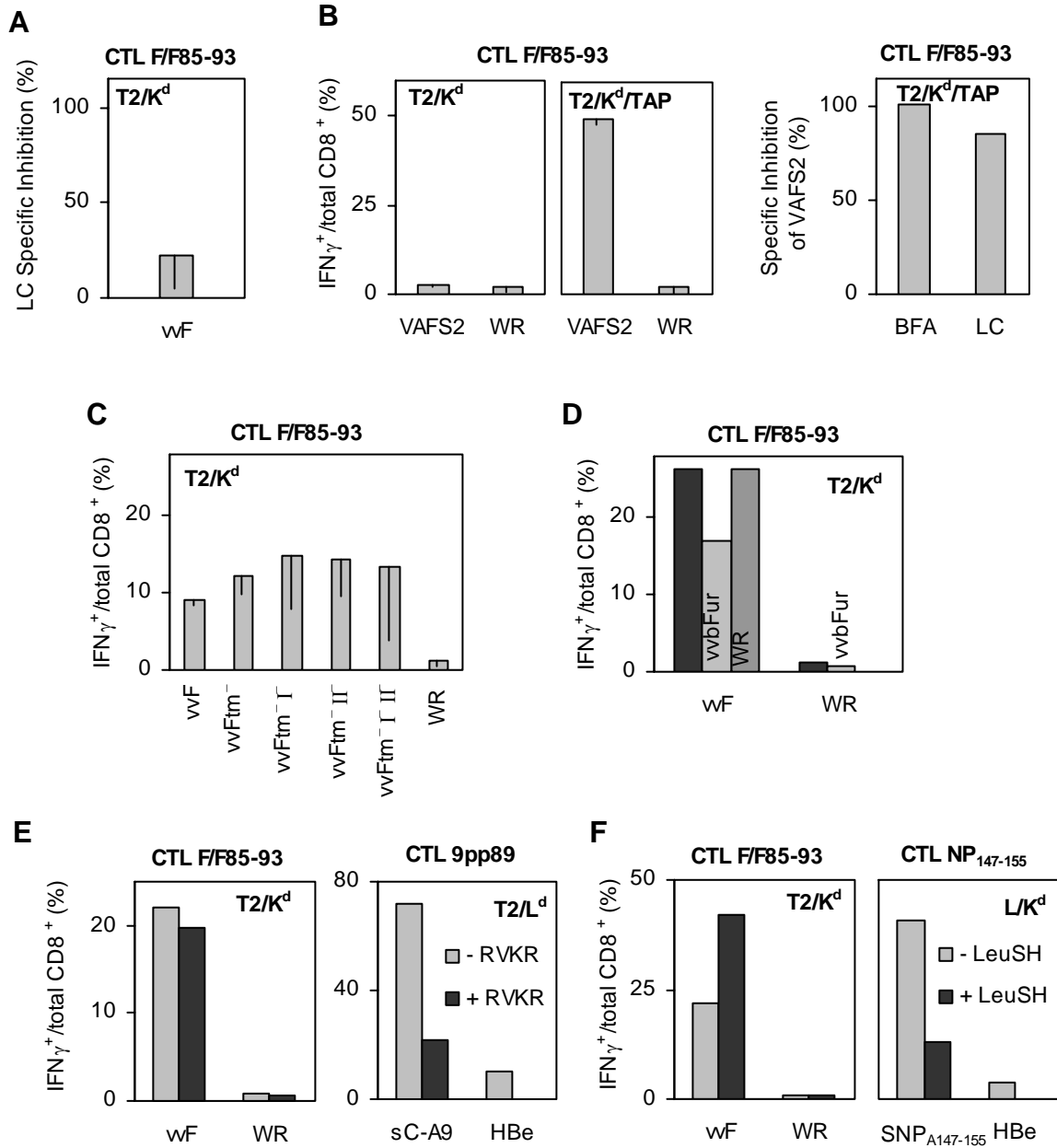


Figure 5.

TAP-independent exogenous presentation of epitope F249-258

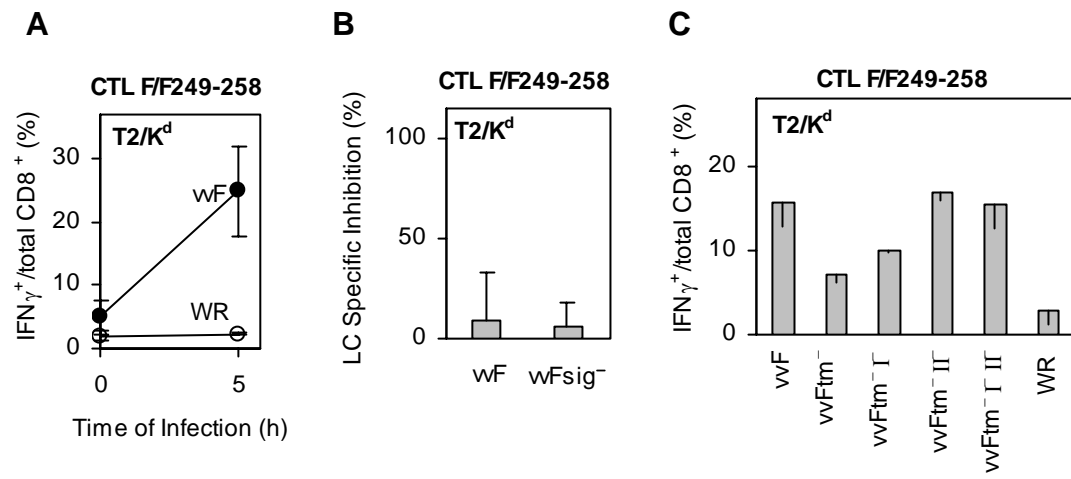


Figure 6.

